

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

United States Patent and Trademark
Office
(Box PCT)
Crystal Plaza 2
Washington, DC 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

| | |
|--|--|
| Date of mailing (day/month/year) 10 July 1999 (10.07.99) | Applicant's or agent's file reference K 2607 - hu/msl |
| International application No. PCT/DE98/03155 | Priority date (day/month/year) 27 October 1997 (27.10.97) |
| International filing date (day/month/year) 27 October 1998 (27.10.98) | |
| Applicant NIEHRS, Christof et al | |

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
25 May 1999 (25.05.99)

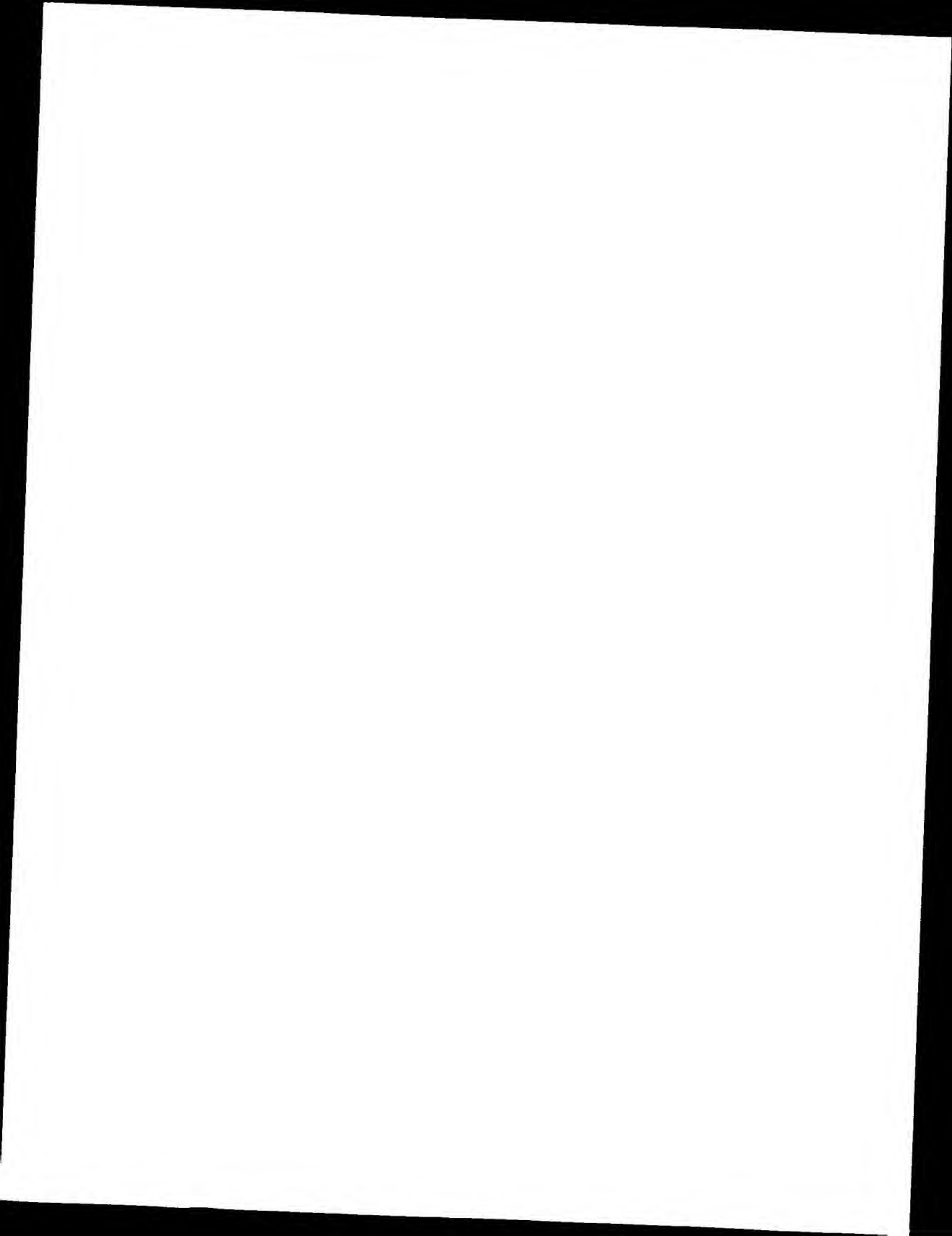
☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

BEST AVAILABLE COPY

| | |
|---|----------------------------------|
| The International Bureau of WIPO 34, chemin des Colombettes 1211 Geneva 20, Switzerland | Authorized officer D. Barmes |
| Facsimile No.: (41-22) 740.14.35 | Telephone No.: (41-22) 338.83.38 |



PCTWELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

| | | | |
|--|--|---|---|
| (51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/18, C07K 14/475, 16/22, C12N 5/10, A61K 38/22, 48/00, G01N 33/53, C12Q 1/68 | | A1 | (11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/22000 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 6. Mai 1999 (06.05.99) |
| (21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03155 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. Oktober 1998 (27.10.98) (30) Prioritätsdaten: 197 47 418.7 27. Oktober 1997 (27.10.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-69120 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): NIEHRS, Christof [DE/DE]; Klingenteichstrasse 6b, D-69117 Heidelberg (DE). GLINKA, Andrei [RU/DE]; Erlenweg 22, D-69126 Heidelberg (DE). (74) Anwalt: HUBER, Bernard; Truderinger Strasse 246, D-81825 München (DE). | | (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE). Veröffentlicht <i>Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist; Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.</i> | |
| (54) Title: INHIBITOR PROTEIN OF THE WNT SIGNAL PATHWAY (54) Bezeichnung: INHIBITOR-PROTEIN DES WNT-SIGNALWEGS (57) Abstract <p>An inhibitor protein of the wnt signal pathway, a DNA coding for such a protein and a process for preparing such a protein are disclosed, as well as the use of the DNA and protein and antibodies against said protein.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.</p> | | | |

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

| | | | | | | | |
|----|------------------------------|----|-----------------------------------|----|---|----|--------------------------------|
| AL | Albanien | ES | Spanien | LS | Lesotho | SI | Slowenien |
| AM | Armenien | FI | Finnland | LT | Litauen | SK | Slowakei |
| AT | Österreich | FR | Frankreich | LU | Luxemburg | SN | Senegal |
| AU | Australien | GA | Gabun | LV | Lettland | SZ | Swasiland |
| AZ | Aserbaidshan | GB | Vereinigtes Königreich | MC | Monaco | TD | Tschad |
| BA | Bosnien-Herzegowina | GE | Georgien | MD | Republik Moldau | TG | Togo |
| BB | Barbados | GH | Ghana | MG | Madagaskar | TJ | Tadschikistan |
| BE | Belgien | GN | Guinea | MK | Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien | TM | Turkmenistan |
| BF | Burkina Faso | GR | Griechenland | ML | Mali | TR | Türkei |
| BG | Bulgarien | HU | Ungarn | MN | Mongolei | TT | Trinidad und Tobago |
| BJ | Benin | IE | Irland | MR | Mauretanien | UA | Ukraine |
| BR | Brasilien | IL | Israel | MW | Malawi | UG | Uganda |
| BY | Belarus | IS | Island | MX | Mexiko | US | Vereinigte Staaten von Amerika |
| CA | Kanada | IT | Italien | NE | Niger | UZ | Usbekistan |
| CF | Zentralafrikanische Republik | JP | Japan | NL | Niederlande | VN | Vietnam |
| CG | Kongo | KE | Kenia | NO | Norwegen | YU | Jugoslawien |
| CH | Schweiz | KG | Kirgisistan | NZ | Neuseeland | ZW | Zimbabwe |
| CI | Côte d'Ivoire | KP | Demokratische Volksrepublik Korea | PL | Polen | | |
| CM | Kamerun | KR | Republik Korea | PT | Portugal | | |
| CN | China | KZ | Kasachstan | RO | Rumänien | | |
| CU | Kuba | LC | St. Lucia | RU | Russische Föderation | | |
| CZ | Tschechische Republik | LI | Liechtenstein | SD | Sudan | | |
| DE | Deutschland | LK | Sri Lanka | SE | Schweden | | |
| DK | Dänemark | LR | Liberia | SG | Singapur | | |
| EE | Estland | | | | | | |

Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

5

Der wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und -Differenzierung während der Embryonal-Entwicklung von *Drosophila*, *Xenopus laevis* und der Maus. Der wnt-Signalweg umfaßt die Kombination von sekretorischen Glykoproteinen, die durch wnt-Gene, z.B. *Xwnt-8*, kodiert sind, und wnt-Rezeptoren, an die die Glykoproteine binden. Ferner ist der wnt-Signalweg beim Menschen kausal im Colon- und Mammakarzinom sowie dem Melanom impliziert (vgl. Peifer, M., *Science* 275, (1997), 1752-1753). Inhibitoren des wnt-Signalwegs könnten daher eine Möglichkeit darstellen, therapeutisch bei Tumorerkrankungen eingreifen zu können.

15

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem der wnt-Signalweg inhibiert werden kann.

20

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das den wnt-Signalweg inhibiert. Der Anmelder hat gefunden, daß die

Expression des wnt-Gens, Xwnt-8, in *Xenopus laevis* zur Ausbildung von Siamesischen Zwillingen führt. Diese Mißbildung wird verhindert, wenn gleichzeitig das vorstehende Protein exprimiert wird. Dieses Protein ist ein sekretorisches Protein von etwa 40 kD. Es weist zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Cysteinreichen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf. Varianten des Proteins sind in Form ihrer DNAs in Fig. 2 angegeben. Desweiteren hat der Anmelder erkannt, daß Varianten des Proteins in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (vgl. Tabelle 1 und Fig. 3).

In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "wnt-Inhibitor" (wnt-I) bezeichnet.

In bevorzugter Ausführungsform weist (wnt-I) die in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf.

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für (wnt-I) kodierende Nukleinsäure. Diese kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

- (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Die DNA von Fig. 2 umfaßt sieben DNAs, die aus *Xenopus laevis*, Maus, Mensch oder Huhn stammen und für (wnt-1) kodieren. Sechs dieser DNAs wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) am 19. Sept. 1997 wie folgt hinterlegt:

5

- Fig. 2.1 (DNA aus Mensch) als phdkk-3 unter DSM 11762
- Fig. 2.2 (DNA aus Huhn) trägt die Bezeichnung pcdkk-3
- Fig. 2.3 (DNA aus Maus) als pmdkk-2 unter DSM 11759
- Fig. 2.4 (DNA aus Mensch) als phdkk-2 unter DSM 11761
- 10 Fig. 2.5 (DNA aus Maus) als pmdkk-1 unter DMS 11758
- Fig. 2.6 (DNA aus Mensch) als phdkk-1 unter DSM 11760
- Fig. 2.7 (DNA aus *Xenopus laevis*) als pRNdkk-1 unter DSM 11757

15

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

20

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer *Xenopus laevis*-cDNA-Bibliothek auszugehen (vgl. Glinka, A. et al., Mechanisms Develope. 60, (1996), 221-231). Von den einzelnen cDNA-Klonen werden mittels RNA-Polymerase entsprechende mRNAs synthetisiert. Diese werden zusammen mit mRNA von wnt-Genen, z.B. Xwnt-8, in *Xenopus laevis* mikroinjiziert. Es wird auf die Ausbildung von Siamesischen Zwillingen bei *Xenopus laevis* gescreent. Diese werden erhalten, wenn die mRNA des wnt-Gens alleine oder zusammen mit solcher *Xenopus laevis* mRNA mikroinjiziert wird, die nicht für (wnt-1) kodiert. Das Nicht-Auftreten von Siamesischen Zwillingen wird somit als Nachweis für das Vorliegen einer mRNA gewertet, die für (wnt-1) kodiert. Solch eine mRNA läßt unmittelbar die entsprechende cDNA erkennen.

25

30

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu

nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, angegeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

5 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

10

Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese cDNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

15

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. trans-
fizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die
erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein
20 solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls
Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehen-
des Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper
25 kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw.
monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere
Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklo-
nalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon
zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fu-
sions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann
30 dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklo-
nalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

30

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den wnt-Signalweg besser zu untersuchen und zu verstehen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-1) in Organismen nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-1) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (wnt-1) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Somit können mit der vorliegenden Erfindung auch Prozesse besser untersucht, d.h. diagnostiziert, und verstanden werden, die mit dem wnt-Signalweg zusammenhängen. Dies sind z.B. Zellproliferation und -Differenzierung sowie Erkrankungen verschiedener Art. Beispiele von letzteren sind Erkrankungen des Auges und der Knochen sowie Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinom sowie Melanom.

Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für und gegen das Vorliegen von (wnt-1) in Organismen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-1) in Organismen inhibiert werden. Andererseits kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-1), insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge von (wnt-1) in Organismen erhöht werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines in bestimmten Geweben induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung von (wnt-1) in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibierung von (wnt-1) genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung des für (wnt-1) kodierenden Gens verwendet.

Somit stellt die vorliegende Erfindung auch die Möglichkeit bereit, in den wnt-Signalweg aktivierend bzw. inhibierend einzugreifen. Erstes könnte z.B. durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Antikörpers gegen (wnt-I) erfolgen. Für letzteres bietet sich an, erfindungsgemäßes (wnt-I) zu verabreichen. Die Aktivierung des wnt-Signalwegs könnte sinnvoll sein, wenn daran gedacht wird, Organismen für Organspende zu züchten. Die Inhibierung des wnt-Signalwegs bietet sich allerdings an, um therapeutisch bei Erkrankungen von Knochen und des Auges sowie bei Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinomen sowie Melanom, eingreifen zu können.

10

Insbesondere zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie gewebespezifisch eingesetzt werden kann. Dies gilt sowohl für Diagnose als auch für Therapie. Beispielsweise eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-1, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Auge. Ferner eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-2, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Bindegewebe, Nieren, Hoden, Milz, Ovarien, Muskel, Uterus, Knorpel, Auge und Brustdrüse. Desweiteren eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-3, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon, besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Auge, Bindegewebe, Lunge, Ovarien, Muskel und Brustdrüse.

15

20

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

25

Fig. 1 zeigt die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II eines erfindungsgemäßen (wnt-I). Die Angabe "-" bedeutet eine Aminosäure, wobei die Zahl der Aminosäuren variabel ist, wenn sie einen Stern aufweisen,

/ 30

Fig. 2 zeigt die Basensequenz von sieben (wnt-I) kodierenden DNAs mit Angabe der Basen, die zu den Aminosäure-Konsensus-Sequenzen

- 7 -

von (wnt-1) beitragen.

Fig. 3 zeigt die Expression von drei (wnt-1) kodierenden DNAs, DKK-1, DKK-2 und DKK-3, in Geweben.

5

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (wnt-1)

10 Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (wnt-1) wurde die DNA von Fig. 2.6, phdkk-1 mit Bam HI-Linkern versehen, anschließend mit Bam HI gespalten und in den mit Bam HI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/wnt-1 erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und einem erfindungsgemäßen (wnt-1) (C-Terminuspartner). pQ/wnt-1 wurde zur Transformation von

15 E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der

20 Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).

25

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

30

Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers
Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M

5 Natriumacetat wurde eine ca. 40 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

10 Pro Immunisierung wurden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)

Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)

Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)

Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)

15 Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. 20 Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. 25 Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschriffe mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung 30 (36 µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.

- 9 -

Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

- 5 Pro Immunisierung wurden 40 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
10 Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

15 Pro Immunisierung wurden 12 μ g Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

- 20 Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion

25

Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen.

30

Tabelle 1: Expression von erfindungsgemäßen DNAs in Mausembryonen

| | Dkk-1 | Dkk-2 | Dkk-3 |
|------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|
| Neuroepithelium | | | |
| E9.5 diencephalon | +++ ventral | +++ medial | + medial |
| E12.5 | telencephalon M/mantle | hypothalamus | telencephalon M/ ventricular zone |
| Eye | pigmented epithelium | choroid | retina |
| Spinal cord | -/+ | - | ventricular zone Roof plate |
| Mesoderm: | | | |
| Heart E10 | bulbis cordis Endocardium septum transversum | endothelium | myocardium |
| Heart E12 | endocardial cushion | endothelium | endocardial cushion |
| Blood vessels | +++ aorta | +++ pulmonary artery | +++ aorta + pulmonary artery |
| Limb bud mesenchyme | E9 S | I | D |
| Bone E12 | perichondrium | S /mesenchyme | perichondrium I/mesenchyme |

- 11 -

| | | | |
|------------------|----------------------|-----|-----|
| Bone E15 | Ossification centers | - | - |
| Urogenital | nephric duct | - | - |
| | S-shaped body | - | - |
| | Comma shaped body | - | - |
| Palate | +++ | ++ | + |
| Hair follicle | +++ mesenchyme | + | + |
| | + epithelium | - | - |
| Tooth mesenchyme | - | - | +++ |
| Trunk mesoderm | +/- | +++ | ++ |

Legende: Mesoderm: (D) deep, (I) intermediate (L) lateral, (M) medial, (S), superficial.
 Expressionsstärke: (-) absence, (+/-) very weak expression, (++) medium, (+++) strong, (+++) very strong.

Patentansprüche

- 5 1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine
 der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II
 umfaßt.
- 10 2. Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein die Aminosäure-Konsensus-
 Sequenzen I und II umfaßt.
3. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 15 4. DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA umfaßt:
 (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Ba-
 senpaare unterschiedliche DNA,
 (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
 (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten geneti-
 schen Code verwandte DNA.
- 20 5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
- 25 7. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2, umfas-
 send die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeig-
 neten Bedingungen.
- 30 8. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
9. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Dia-
 gnose und/oder Therapie.

10. Verwendung der DNA nach Anspruch 3 oder 4 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.

1/11

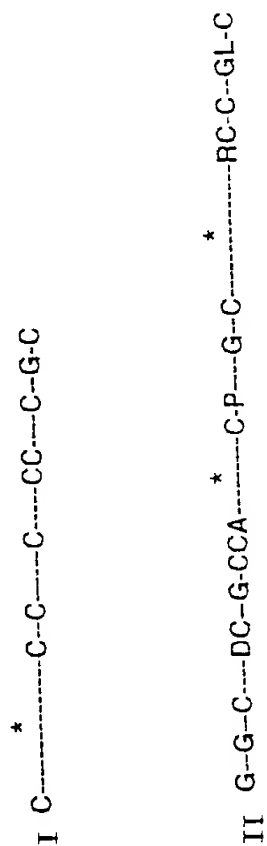


Fig. 1

[illegible]

Fig. 2





5/11

| | | |
|-----|---|----------|
| 433 | | phdtk-3 |
| 424 | GTGGAGAAACAAGAAATCATGAGTGATATGATGAAGACTGTGAAACAGGAAAGT | pcdtk-3 |
| 265 | ATGGCAACCCGGCATAGAGATCGCAACCAATGACCTGAGATGGC | pmcdk-2 |
| 226 | ATGGTACTCGGCACAGAGATCGAAACCAATGACCTGAGATGGC | phdtk-2 |
| 500 | AGGAAAGCATCATTTGAAACCTTGGTAAATGACCAACAGCGCCGCGGGGATGGATATC | pmcdk-1 |
| 479 | AGGAAACCATCATCTGAAAGCTTTGGTAAATGATCATAGCACCC.....TTGGATGGGTATT | phdtk-1 |
| 526 | AAGAAACCATTCCTGGAAACATATAATAATGCTGATGATG.....AACAAAGGATACTCATTT | prNdtk-1 |
| 433 | | phdtk-3 |
| 484 | ATTGCCAGTTCTCCACCTTTGAAATACAAAGTGTGTCAGCCCCCTGTAAACCCCAAGCATACACACCT | pcdtk-3 |
| 325 | AGAAATCTAGGAAAGGCCACACACTCCAAAGATGCCCTCATATAAAAGGATCAATGAAAGGAGACCCAT | pmcdk-2 |
| 286 | AGAAATCTAGGAAAGSACACACACACTCAAGATGTCACATATAAAAGGATCAATGAAAGGAGACCCCT | phdtk-2 |
| 560 | CCAGAAAGAACCACTGACTTCAAAATATATGACACCCCAAGGATCAAGAGGATCCGCTCT | pmcdk-1 |
| 533 | CCAGAAAGAACCACTTGTCTTCAAAATATATGACACCCCAAGGATCAAGAGGATCTGCTT | phdtk-1 |
| 583 | CCAAATTAAACCACTCCCTCATCTGGAATGCAAGTCCCTTAAAGGATGATGATGATG | prNdtk-1 |
| 433 | | phdtk-3 |
| 544 | GCTCAGAGAGATGTTGAATGCTGCCGGAAGAACCAAGCTTTGTGTTTGGGGTGAAGTGAAGGAAAG | pcdtk-3 |
| 385 | GCCATACGGTCAATGACATGCAATGATGGGTATGTTGTGCTTGGCCATCTGGGACCAAA | pmcdk-2 |
| 346 | GCCATACGGTCAATGACATGCAATGATGGGTATGTTGTGCTTGGCCATCTGGGACCAAA | phdtk-2 |
| 620 | GCCATACGGTCAATGACATGCAATGATGGGTATGTTGTGCTTGGCCATCTGGGACCAAA | pmcdk-1 |
| 593 | GCTTCCGGTCAATGACATGCAATGATGGGTATGTTGTGCTTGGCCATCTGGGACCAAA | phdtk-1 |
| 643 | GCTTCCGGTCAATGACATGCAATGATGGGTATGTTGTGCTTGGCCATCTGGGACCAAA | prNdtk-1 |

Fig. 2 (Forts.)





7/11

433
 783 CCTGATGGAGTACTAGAGCGCTGCCCATGTGCAAGTGGCTTGAICGCGCCAACTCAGAGGC
 619 AATACACTG.GAAGAGTCACTACACTAGCAGACTGTGAAATTTGTGTAATTAAGCAITATGGCC
 580 CACCATTGAGGAAACATCATCAATTCAGAGACTGTGAAAGTGTGTAATTAAGCAITATAGCC
 856 ...ACCGACAGTC..IAAAIATGATGGACTCTTTTATCTAAATAATGCTACGAAATATC
 829
 883 CGAGGCCCTACAGAG..CCTGAAAGGACCCTTCTCTAAATTAAAGCTAAATTAAGACITTGGTAC

phdtkk-3

pcdtkk-3

pmdtkk-2

phdtkk-2

pmdtkk-1

phdtkk-1

pRNdtkk-1

433
 843 AGCCACAGTACTACATCTGTGTGTAACCTGTCCTCCAAAGAAACCCAGGAAATAACGTAATAAA
 678 ATGATGGAAACCTGGATTGGAAATGCGGAAGAAATGAGGGATGTGGTAAGAAATGTGGAGCAG
 640 AIGGTGGAAATAAAGGTTCAAGATGCAGAGAGAAAT...GGCTAAATAAAGAAACGTTGAATAAG
 910 CTTTATGATTGTGAGCTCAATCCCAAGGATGTAGGAATCTTCAGTGTGTAATTAAGCAT
 829
 941 CTGCAATGTTAATTTCTCAAGTTTACAAGAGTGCCTGCTCTCCCTGAAACCCGGAATGCTG

phdtkk-3

pcdtkk-3

pmdtkk-2

phdtkk-2

pmdtkk-1

phdtkk-1

pRNdtkk-1

433
 903 GAAGATCCCTTGAACATGGATGAGATGCCATTTAICAGITTAATACCCAGAGATAITCTT
 730 AAGAGGGCCAGGACIGAAICAAAGTAGAGTCGACAAACCAAGIACIACCAGTGTCTCCG
 697 AATATAGATGATCACAATAAATAAATAAATAAAGATGCGGCCGCAAGCTTATTCCTTTA
 970 TCCGACAATACTTTCCAAAGCTCTGGAATGTAAAGGACTTTGTTCTTGTATGGAACCTCCC
 829
 1001 CGCAACTTGTTCCTTTTTTGGAGGAACCTTCCTAATTAATGCTAAATACAGTAAATTACIG

phdtkk-3

pcdtkk-3

pmdtkk-2

phdtkk-2

pmdtkk-1

phdtkk-1

pRNdtkk-1

Fig. 2 (Forts.)



433
963 TCTGATTACGAAAGAAAGCAGCTCATTCAGGAAAGTGCGTAAAGAAATTAGAAAGCCTGGAG
798 TTATGTGCTTCATCTATGTAAATAATGTACACATTTGTGAAAAATGCTAATTATTAAGAAGAA
757 GTGAGGGTTAAT.....
1030 CTGTGATTGCAgTAAATTACTGTGTGTGTAATACTCTCAGTGTGGCACATTACCTGTAAATGCT
829
1081 TGTTGTAAATACTACGCAAGGAGACCTGTAAAAAAGTGTAAATACCCGGTGTAATAGAAAAGTG

phdkk-3
pcdkk-3
pmckk-2
phdkk-2
pmdkk-1
phdkk-1
pRNdkk-1

433
11023 GACC AAGCAGGTGTGAAATCTGAGCATGACCCGGCTCATGACCTATTTCTGCGAGATGAA
850 AGCACACCCATGGGAAATTACAAAAA
769
11090 AgCAAAAC TTTTAA TTTTCTA gAgGTGTGgTACAT T6CC TGT TTTCTCTT6CATGT
829
11121 TACATGATCTTCCTCTATGTGTAACCTG6CCACCTTGTACAT TCCGACGCGCTCTCCCTTTT

phdkk-3
pcedk-3
prndkk-2
phxdkk-2
prndkk-1
phckk-1
pRNdkk-1

433
1083 ATATGAAGTTCAAAACACCAGTTTAGTTAGTCCCTAGAAATTGTTGCTAGTGTGCTTAA
882
769
1150 GAATTTTITGTTGACCTGACCTCAATAAATACTATATATGAGTAgTgAA
829
1181 TATATATATATATAAATAATATATTATATTAGTAGAGTTTACGCTAGTATAGTCTG

Fig. 2 (Forts.)

| | phdtkk-3 | pcdtkk-3 | pmcdtkk-2 | phdtkk-2 | pmcdtkk-1 | phdtkk-1 | pmcdtkk-1 |
|------|-----------------------|---------------|--------------|-----------------|-----------|----------|-----------|
| 433 | | | | | | | |
| 1143 | CATACACCCCTTAACAGATAC | CTGCTGGATAGAA | GTGCAATAAACA | CTTCATTGAGCATCC | | | |
| 882 | | | | | | | |
| 769 | | | | | | | |
| 1210 | AAAAAAAAAAAAAAAAAA | | | | | | |
| 829 | | | | | | | |
| 1241 | ATGTTTAAATGAAATGAAAC | ATTCTAAACTTAA | AAACAAACAA | AAAAA | AAAAA | AAAAA | AAAAA |

| Accession | Sequence |
|-----------|---|
| 433 | |
| 1203 | 6TTTTCGTCACCAACCTGCAAGTTCAAAATCAATGTTGAATTCACCTCAATCTTGGACC |
| 882 | |
| 769 | |
| 1227 | |
| 829 | |
| 1298 | |

| | | | | | | |
|------|--|-------|-------|-------|-------|-----------|
| 433 | | | | | | pdxkk-3 |
| 1263 | AAACTTCCATCAAGACAAAIGAGAAAGGCAICAGTGTTTCCTTGGATTAAATCCTTTC | | | | | pcdkk-3 |
| 882 | | | | | | pmdkk-2 |
| 769 | | | | | | phdtkk-2 |
| 1227 | | | | | | pndkk-1 |
| 829 | | | | | | pchk-1 |
| 1298 | | | | | | pRNdtkk-1 |

Fig. 2 (Forts.)

10/11

| | | |
|------|--|---------|
| 433 | | phdkk-3 |
| 1323 | CITTTGACAGCAGAAATAAACCTATCAGTACICGTACTCAITAAATAAACACACGGAGCA | pcdkk-3 |
| 882 | | pmdkk-2 |
| 769 | | phdkk-2 |
| 1227 | | pmdkk-1 |
| 829 | | phdkk-1 |
| 1298 | | pmdkk-1 |
| 433 | | phdkk-3 |
| 1383 | T | pcdkk-3 |
| 882 | | pmdkk-2 |
| 769 | | phdkk-2 |
| 1227 | | pmdkk-1 |
| 829 | | phdkk-1 |
| 1298 | | pmdkk-1 |

Fig. 2 (Fort.s.)

11/11

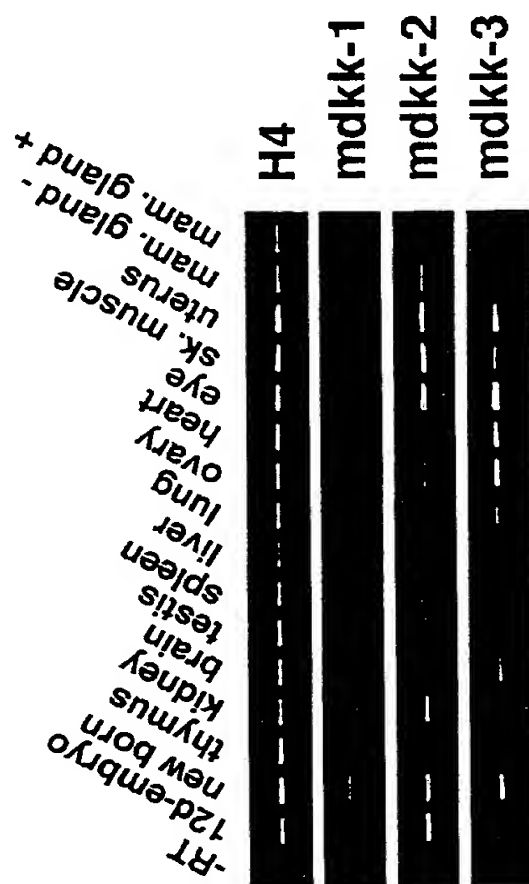


Fig. 3



SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Deutsches Krebsforschungszentrum
- (B) STRASSE: Im Neuenheimer Feld 280
- (C) ORT: Heidelberg
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 69120

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Inhibitorprotein des wnt-Signalwegs

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 7

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER VORANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 19747418.7

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1297 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

| | |
|---|-----|
| GACAGTCGGA GCGGGCGCTG CAGCATCAAA GGGACTTATC TTGGAGGACT TGTGAATTCT | 60 |
| CATCCTGCCA TTGTGGTTAC TGAGTCTGGT TGGACAGAGG AATGGGCAGC AACATGTTCC | 120 |
| CGGTGCCTCT TATTGTCTTT TGGGGTTTTA TCTTGATGG GCACTTGGC TTTGTCATGA | 180 |
| TGACCAACTC CAACTCCATC AAGAATGTGC CGGCGGCACC AGCAGGTCAG CCCATTGGCT | 240 |
| ACTACCCTGT GAGCGTCAGT CCGGACTCCC TATATGATAT TGCCAACAAG TACCAACCTC | 300 |
| TGGATGCCTA CCGCTCTAC AGTTGCACGG AAGATGATGA CTGTGCCCTT GATGAATTCT | 360 |
| GTCACAGTTC CAGAAACGGC AACTCTCTGG TTTGCTTGGC ATGCCGAAA CGCAGAAAAGC | 420 |
| GTTGCCTGAG GGACGCCATG TGCTGCACAG GCAACTACTG TAGCAACGGA ATTTGTGTCC | 480 |
| CTGTGGAGCA AGATCAAGAG CGCTTCCAAC ACCAGGGATA CCTGGAAGAA ACCATTCTGG | 540 |
| AAAACATAA TAATGCTGAT CATGCAACAA TGGATACTCA TTCCAAATTA ACCACGTCCC | 600 |



| | |
|--|------|
| CATCTGGAAT GCAGCCCTTT AAAGGCCGTG ATGGTGATGT TTGCCTCCGA TCAACTGACT | 660 |
| GTGCGCCAGG TCTATGCTGT GCGCGTCATT TCTGGTCAAA GATCTGCAAG CCGGTCCTTG | 720 |
| ATGAAGGCCA AGTGTGCACC AAGCACAGGA GGAAAGGCTC TCACGGGCTA GAGATTTTCC | 780 |
| AGCGTTGTCA CTGCGGTGCC GGA CTCTCGT GCCGGTTACA GAAAGGAGAA TTTACAACTG | 840 |
| TCCCTAAAAC ATCGAGACTT CACACTTGCC AAAGACACTA AGCGAGGCCT ACAGAGCCTG | 900 |
| AAGGACCTTC TCTAAATTAA GCTAATTAAG ACTTTGGTAC CTGCATGTTA TTTTCTCAGT | 960 |
| TTACATGAAG TGCTCTGGTC TTCCCTGAAC CCGGAAGCTG CGCAACTTGT TTCTTTTTTT | 1020 |
| GAGGAACTTC CTAATTAATG CTAATTACAG TAAATTACTG TGTGTAAAT ACTACGCAAG | 1080 |
| GAGACCTGTA AAAACTGTAA ATACCCGTGT ATAGAAAGTG TACATGATCT TCTCTATTGT | 1140 |
| AACCTGCCAC CTTGTACATT CCGACGCGCT CTTCCCTTTT TATATATATA TATATATAAA | 1200 |
| TATATATTAT ATTATGTAGA GTTTACGTCT AGTATGTCTG TATTTTAAAT TGAAATAAAA | 1260 |
| CATTTCTAAA CTTAAAAACA AAAAAAAAAA AAAAAA | 1297 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 881 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

| | |
|--|-----|
| TGCAGGCATG AACAAAGGACT GGGTTCGGCG GCAGTGAGAA GGGCAAAGC CTGGGGCAGG | 60 |
| CCTACCCCTG CAGCAGTGAT AAGGAATGTG AAGTTGGAAG ATACTGCCAC AGTCCCCACC | 120 |
| AAGGTTTCATC AGCCTGCATG CTCTGTAGGA GGAAAAAGAA ACGATGCCAC AGAGATGGGA | 180 |
| TGTGTTGCCC TGSTACCCGC TGCAATAATG GAATCTGCAT CCCAGTCACT GAGAGCATCC | 240 |
| TCACCCCA CA TATCCCAGCT CTGGATGGCA CCCGGCATAG AGATCGCAAC CATGGTCACT | 300 |
| ATTCCAACCA TGACCTGGGA TGGCAGAATC TAGGAAGGCC AACTCCAAG ATGCCTCATA | 360 |
| TAAAAGGACA TGAAGGAGAC CCATGCCTAC GSTCATCAGA CTGCATTGAT GGGTTTTGTT | 420 |
| GTGCTCGCCA CTTCTGGACC AAAATCTGCA AACCAGTGCT CCATCAGGGG GAAGTCTGTA | 480 |
| CCAAACAACG CAAGAAGGGT TCGCACGGGC TGGAGATTTT CCAGAGGTGT GACTGTGCAA | 540 |
| AGGGCCTGTC CTGCAAAGTG TGGAAAGATG CCACCTACTC TTCCAAAGCC AGACTCCATG | 600 |
| TATGCCAGAA GATCTGATAA AACTGGAAG AGTCATCACT AGCAGACTGT GAATTTGTGT | 660 |

3

ATTTAATGCA TTATGGCATG ATGGAAACCT GGATTGGAAT GCGGAAGAAT GAGGGATGTG 720
 GTAAGAATGT GGAGCAGAAG AGGGCAGGAC TGAATCAAGT AGAGTCGACA ACAACCAAAG 780
 TACTACCACT GCTTCCGTGA TGTGCCTCAT CTATGTAAAT AATGTACACA TTTGTGAAAA 840
 TGCTATTATT AAAAGAAAGC ACACCATGGA AATTACAAAA A 881

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 1226 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

GACCCACGCG TCCGTGCCTG TTTGCGTCCT TCGGAGATGA TGGTTGTGTG TGCACCGGCA 60
 GCTGTCCGGT TCTTGGCCGT GTTTACAATG ATGGCTCTCT GCAGCCTCCC TCTGCTAGGA 120
 GCCAGTGCCA CCTTGAATC AGTTCTCATC AATTCCAACG CGATCAAGAA CCTGCCCCCA 180
 CCGCTGGGTG GTGCTGGGGG GCAGCCGGGC TCTGCTGTCA GTGTGGCGCC GGGAGTTCTC 240
 TATGAGGGCG GGAACAAGTA CCAGACTCTT GACAACCTACC AGCCCTACCC TTGCGCTGAA 300
 GATGAGGAGT GCGGCTCTGA CGAGTACTGC TCCAGCCCCA GCCGCGGGGC AGCCGGCGTC 360
 GGAGGTGTAC AGATCTGTCT GGCTTGCCGA AAGCGCAGGA AGCGCTGCAT GACGCACGCT 420
 ATGTGCTGCC CCGGGAATA CTGCAAAAAT GGAATATGCA TGCCCTGTGA CCACAGCCAT 480
 TTTCTCGAG GGGAAATTGA GGAAAGCATC ATTGAAAACC TTGGTAATGA CCACAACGCC 540
 GCCGCGGGGG ATGGATATCC CAGAAGAACC AACTGACTT CAAAAATATA TCACACCAAA 600
 GGACAAGAAG GCTCCGTCTG CCTCCGATCA TCAGACTGTG CCGCAGGGCT GTGTTGTGCA 660
 AGACACTTCT GGTCCAAGAT CTGTAAACCT GTCCTTAAAG AAGGTCAGGT GTGCACCAAG 720
 CACAAACGGA AAGGCTCCCA CGGGCTGGAG ATATTCCAGC GCTGTTACTG CGGGGAAGGC 780
 CTGGCTTGCA GGATACAGAA AGATCACCAT CAAGCCAGCA ATTCTTCTAG GCTCCACACC 840
 TGCCAGAGAC ACTAAACCGA CAGTCTAAAT ATGATGGACT CTTTTTATCT AATATATGCT 900
 ACGAAAATCC TTTATGATTT GTCAGCTCAA TCCCAAGGAT GTAGGAATCT TCAGTGTGTA 960
 ATTAAGCATT CCGACAATAC TTTCAAAAG CTCTGGAGTG TAAGGACTTT GTTTCTTGAT 1020
 GGAACCTCCC TGTSATTGCA GTAAATTACT GTGTTGTAAA TCCTCAGTGT GGCACCTACC 1080
 TGTAATGCA GCAAACTTT TAATTATTTT TCTAGAGGTG TGCTACATTG CTTGTTTCT 1140



CTTGCATGTA AATTTTTTTTT GTACACGGTT GATTGTCTTG ACTCATAAAT ATTCTATATT 1200
 GGAGTAGAAA AAAAAAAAAA AAAAAA 1226

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 768 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

| | |
|--|-----|
| ATACGACTCA CTATAGGGAA TTTGGCCCTC GAGGCCAAGA ATTCGGCACG AGGGTTGGGA | 60 |
| GGTATTGCCA CAGTCCCCAC CAAGGATCAT CGGCCTGCAT GGTGTGTCGG AGAAAAAGA | 120 |
| AGCGCTGCCA CCGAGATGGC ATGTGCTGCC CCACTACCCG CTGCAATAAT GGCATCTGTA | 180 |
| TCCCAGTTAC TGAAAGCATC TTAACCCCTC ACATCCCGGC TCTGGATGGT ACTCGGCACA | 240 |
| GAGATCGAAA CCACGGTCAT TACTCAAACC ATGACTTGGG ATGGCAGAAT CTAGGAAGAC | 300 |
| CACACACTAA GATGTCACAT ATAAAAGGCG ATGAAGGAGA CCCCTGCCTA CGATCATCAG | 360 |
| ACTGCATTGA AGGGTTTTGC TGTGCTCGTC ATTTCTGGAC CAAAATCTGC AAACCACTGC | 420 |
| TCCATCAGGG GGAAGTCTGT ACCAAACAAC GCAAGAAGGG TTCTCATGGG CTGGAAATTT | 480 |
| TCCAGCGTTG CGACTGTGCG AAGGGCCTGT CTTGCAAAGT ATGGAAAGAT GCCACCTACT | 540 |
| CCTCCAAAGC CAGACTCCAT GTGTGTCAGA AAATTTGATC ACCATTGAGG AACATCATCA | 600 |
| ATTGCAGACT GTGAAGTTGT GTATTTAATG CATTATAGCA TGGTGGAAAA TAAGGTTTCAG | 660 |
| ATGCAGAAGA ATGGCTAAAA TAAGAAACGT GATAAGAATA TAGATGATCA CAAAAAAAAA | 720 |
| AAAAAAAAAG ATCGGGCCGC AAGCTTATTC CCTTTAGTGA GGGTTAAT | 768 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 828 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN



(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

| | |
|--|-----|
| TGGCCCCGCA CGCCAAAAAT TCGGCACGAG GGTCTGGCAC TCAGAGGATG CTCTGACCTT | 60 |
| GAAAGGGTCC TATCTGGAGA CGAGGGAGTA CAACGTGCTG AATGTGTGCG GTTCAGGGAG | 120 |
| CATTGGTAA CCCTGCATTT GGGAGCAGTG GGCAC TAACC GGT TTTGGAG AGGTGGACAC | 180 |
| ATAAGGACTG TGATCAGCGC CCGGGTCCAA GAGGGCGGGT ACCTGGACCT CTGGGTGCCT | 240 |
| CACCTCTCC CCGAACCTT CCCACAGCCG TACCCGTGCG CAGAGGACGA GGAGTGC GGC | 300 |
| ACTGATGAGT ACTGCGCTAG TCCCACCCCG CGGAGGGGAC CGCCGGCCGT GCAAATCTGT | 360 |
| CTCGCCTGCA GGAAGCGCCG AAAACGCTGC ATGCGTCACG CTATGTGCTG CCCC GGAAT | 420 |
| TACTGCAAAA ATGGAATATG TGTGTCTTCT GATCAAAATC ATTTCCGAGG AGAAATTGAG | 480 |
| GAAACCATCA CTGAAAGCTT TGGTAATGAT CATAGCACCT TGGATGGGTA TTCCAGAAGA | 540 |
| ACCACCTTGT CTCAAAAAAT GTATCACACC AAAGGACAAG AAGGTTCTGT TTGTCTCCGG | 600 |
| TCATCAGACT GTCCCTCAGG ATTGTGTTGT GCTAGACACT TCTGGTCCAA GATCTGTAAA | 660 |
| CCTGTCTGA AAGAAGGTCA AGTGTGTACC AAGCATAGGA GAAAAGGCTC TCATGGACTA | 720 |
| GAAATATTCC AGCCTTGTTA CTGTGGAGAA GGTCTGTCTT GCCGGATACA GAAAGATCAC | 780 |
| CATCAAGCCA GTAATTCTTC TAGGCTTCAC ACTTGTCAGA GACACTAA | 828 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 432 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Einzelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

| | |
|--|-----|
| GCGGTGGCGG CCGCTCTAGA ATAGTGGATC CCCC GGGCTG CAGGAATTGG GCACGAGCGG | 60 |
| CTGCGGGCGC AGAGCGGAGA TGCAGCGGCT TGGGCCACCC TGCTGTGCCT GCTGCTGGCG | 120 |
| GCGGCGGTCC CCACGGCCCC CGCGCCCGCT CCGACGGCGA CCTCGGCTCC AGTCAAGCCC | 180 |
| GGCCCGGCTC TCAGCTACCC GCAGGAGGAG GCCACCCTCA ATGAGATGTT CCGCGGGTGA | 240 |
| GGAAGTGATG GAGGACACGC AGCACAAATT GCGCAGCGCG GTGGAAGAGA TGGAGGCAGA | 300 |
| AGAAGCTGCT GCTAAAGCAA TCATCAGAAG TGAACCTGGC AACTTACCT CCCAGCTATC | 360 |
| ACAATGAGAC CAACACAGAC ACGAAGGTTG GAAATAATAA CCATCCATGT GCACCGAGAA | 420 |
| ATTCACAAGT TT | 432 |

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 1383 Basenpaare
 (B) ART: Nucleotid
 (C) STRANGFORM: Einzelstrang
 (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Genom-DNA

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(iv) ANTISENSE: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

| | |
|--|------|
| CGGCGAGCGG CAGCGGCGGC TGAGGAGCGC CGGGGATGCG GCGGGGAGAG GGACCGGCGC | 60 |
| CGCGGCGGCG ATGGCTGCTG CTGTTGGCCG TGCTGGCGGC TCTGTGCTGC GCCGCGGCCG | 120 |
| GGAGCGGCGG GCGGCGGCGA GCGGCCAGCC TGGGCGAGAT GCTGCGGGAG GTGGAGGCGC | 180 |
| TGATGGAGGA CACGCAGCAC AAGCTGCGCA ACGCCGTGCA GGAGATGGAA GCTGAAGAAG | 240 |
| AAGGGGCAAA AAAACTGTCA GAAGTAAACT TTGAAACTT ACCTCCCACC TACCATAATG | 300 |
| AGTCCAACAC AGAAACCAGA ATTGGTAATA AAAGTGTCA GACTCATCAA GAAATTGATA | 360 |
| AGGTTACAGA TAACAGAACT GGATCAACAA TTTTTCCTGA GACAATTATT ACATCTATAA | 420 |
| AGGGTGGAGA AAACAAAAGA AATCATGAGT GTATCATTGA TGAAGACTGT GAAACAGGAA | 480 |
| AGTATTGCCA GTTCTCCACC TTTGAATACA AGTGTGAGCC CTGTAAAACC CAGCATAAC | 540 |
| ACTGCTCAG AGATGTTGAA TGCTGCGGAG ACCAGCTTTG TGTGTTGGGGT GAGTGCAGGA | 600 |
| AAGCCACTTC AAGAGGAGAA AATGGTACCA TTTGTGAGAA CCAACATGAC TGCAACCCAG | 660 |
| GAACGTGCTG TGCTTTTCAG AAAGAACTGC TGTTTCCTGT GTGCACTCCG TTACCCGAAG | 720 |
| AAGGTGAACC TTGCCATGAT CCTTCAAACA GACTTCTCAA CCTGATCACC TGGGAAGTGG | 780 |
| AACCTGATGG ACTACTAGAG CGCTGCCCCAT GTGCAAGTGG CTTGATCTGC CAACCTCAGA | 840 |
| GCAGCCACAG TACTACATCT GTGTGTGAAC TGTCTCCAA TGAAACCAGG AAAAACGAAA | 900 |
| AAGAAGATCC CTTGAACATG GATGAGATGC CATTTATCAG TTAAATACCC AGAGATATTC | 960 |
| TTTCTGATTA CGAAGAAAGC AGCGTCATTC AGGAAGTGGC TAAAGAATTA GAAAGCCTGG | 1020 |
| AGGACCAAGC AGGTGTGAAG TCTGAGCATG ACCCGGCTCA TGACCTATTT CTGGGAGATG | 1080 |
| AAATATGAAG TTCAAACACC AGTTTAGTTA GTCCTAGAAA TTGTTGTCTA GTGTCTTGCT | 1140 |
| TACATACACC CTTAACAGAT ACTGCTGGAT AGAAGTGCAA TAAACATCTT CATTGAGCAT | 1200 |
| CCGTTTTCTG GCACCAAACC TGCATGTTCA AATTCATGTT GAATTCCTC AATCTTTGGA | 1260 |
| CCAAACTTTC CATCAAAGAC AAATGAGAAA GGCATCAGTG TTTCTTTGG ATTAATCCTT | 1320 |
| TCCTTTGTAC AGCAGAAATA AACGTATCAG TACTCGTACT CATTAAAAAA ACACACGGAG | 1380 |

CAT

1383

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03155

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/18 C07K14/475 C07K16/22 C12N5/10 A61K38/22
A61K48/00 G01N33/53 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C07K C12N

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| X | SAWADA K ET AL: "Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers." INT J DEV BIOL, JUN 1996, 40 (3) P531-5, XP002096086 SPAIN see the whole document | 3,4 |
| X | -& EMVRT DATABASE Accession number D26311 29-JUL-1994 (Rel. 40, Created) Sawada K XP002096089 see the whole document --- | 3,4 |

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

10 March 1999

Date of mailing of the international search report

23/03/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Gurdjian, D

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03155

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

| Category | Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages | Relevant to claim No. |
|----------|---|-----------------------|
| A | <p>GLINKA A ET AL: "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus." NATURE, OCT 2 1997, 389 (6650) P517-9, XP002096087 ENGLAND see the whole document -----</p> | 1-10 |
| P,X | <p>GLINKA, ANDREI ET AL: "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction" NATURE (LONDON) (1998), 391(6665), 357-362 CODEN: NATUAS;ISSN: 0028-0836, XP002096088 see the whole document -----</p> | 1-10 |

09/530219
Translation

5630

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

| | | |
|--|---|--|
| Applicant's or agent's file reference K 2607 - hu/km | FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416) | |
| International application No. PCT/DE98/03155 | International filing date (day/month/year) 27 October 1998 (27.10.98) | Priority date (day/month/year) 27 October 1997 (27.10.97) |
| International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/18 | | |
| Applicant DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS | | |

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.

2. This REPORT consists of a total of 4 sheets, including this cover sheet.

☒ This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).

These annexes consist of a total of 1 sheets.

3. This report contains indications relating to the following items:

- I ☒ Basis of the report
- II ☐ Priority
- III ☒ Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- IV ☐ Lack of unity of invention
- V ☒ Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- VI ☐ Certain documents cited
- VII ☐ Certain defects in the international application
- VIII ☐ Certain observations on the international application

| | |
|--|---|
| Date of submission of the demand 25 May 1999 (25.05.99) | Date of completion of this report 20 January 2000 (20.01.2000) |
| Name and mailing address of the IPEA/EP | Authorized officer |
| Facsimile No. | Telephone No. |

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/03155

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description, pages 1-11, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims, Nos. _____, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. 1-7, filed with the letter of 23 December 1999 (23.12.1999),
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings, sheets/fig 1/11-11/11, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages _____
- ☐ the claims, Nos. _____
- ☐ the drawings, sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/03155

III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 7

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. _____
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. _____
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ the claims, or said claims Nos. 7 are so inadequately supported
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. _____

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.
PCT/DE 98/03155

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

| | | | |
|-------------------------------|--------|-----|-----|
| Novelty (N) | Claims | 1-6 | YES |
| | Claims | | NO |
| Inventive step (IS) | Claims | 1-6 | YES |
| | Claims | | NO |
| Industrial applicability (IA) | Claims | 1-6 | YES |
| | Claims | | NO |

2. Citations and explanations

See Supplemental Sheet.

Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III and V

1. The present application relates to six specific inhibitors of the wnt signalling pathway, a DNA, a DNA coding for these inhibitors, antibodies as well as the use of the inhibitors.

Although inhibitors of the wnt signalling pathway have already been described in the prior art (D1: Int. J. Biol., Vol. 40: 531-535, 1996; D2: Nature, Vol. 389, 2.10.1997), the claimed inhibitors are different and cannot be clearly derived from this prior art in an obvious manner. Consequently, Claims 1 to 6 meet the requirements of PCT Article 33(2) and (3).

2. The following objections have been raised as regards Claim 7:

The application does not indicate any experimental data to show that the isolated clones can in fact be used for diagnosis and therapy. Indeed, the expression of the clone has not been shown once (with the exception of clone 2.6 phdk-1).

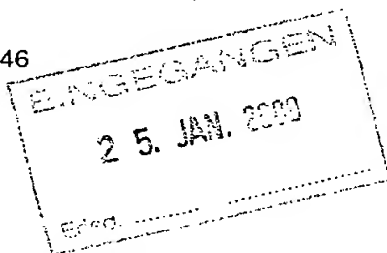
Therefore, a potential use per se for the specific clone is purely speculative. Consequently, there is also no support for the use of the broadened proteins, i.e. defined by the amino acid consensus sequences I and II. Consequently, Claim 7 does not meet the requirements of PCT Articles 5 and 6.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: MIT DER INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNG BEAUFTRAGTE BEHÖRDE

An:

SCHÜSSLER Andrea
Huber & Schüssler
Truderinger Strasse 246
D-81825 München
ALLEMAGNE



PCT

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERSENDUNG
DES INTERNATIONALEN VORLÄUFIGEN
PRÜFUNGSBERICHTS

(Regel 71.1 PCT)

Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

20. 01. 00

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts
K 2607 - hu/km

WICHTIGE MITTEILUNG

Internationales Aktenzeichen
PCT/DE98/03155

Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr)
27/10/1998

Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr)
27/10/1997

Anmelder

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM ... et al

1. Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß ihm die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde hiermit den zu der internationalen Anmeldung erstellten internationalen vorläufigen Prüfungsbericht, gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen, übermittelt.
2. Eine Kopie des Berichts wird - gegebenenfalls mit den dazugehörigen Anlagen - dem Internationalen Büro zur Weiterleitung an alle ausgewählten Ämter übermittelt.
3. Auf Wunsch eines ausgewählten Amtes wird das Internationale Büro eine Übersetzung des Berichts (jedoch nicht der Anlagen) ins Englische anfertigen und diesem Amt übermitteln.
4. **ERINNERUNG**

Zum Eintritt in die nationale Phase hat der Anmelder vor jedem ausgewählten Amt innerhalb von 30 Monaten ab dem Prioritätsdatum (oder in manchen Ämtern noch später) bestimmte Handlungen (Einreichung von Übersetzungen und Entrichtung nationaler Gebühren) vorzunehmen (Artikel 39 (1)) (siehe auch die durch das Internationale Büro im Formblatt PCT/IB/301 übermittelte Information).

Ist einem ausgewählten Amt eine Übersetzung der internationalen Anmeldung zu übermitteln, so muß diese Übersetzung auch Übersetzungen aller Anlagen zum internationalen vorläufigen Prüfungsbericht enthalten. Es ist Aufgabe des Anmelders, solche Übersetzungen anzufertigen und den betroffenen ausgewählten Ämtern direkt zuzuleiten.

Weitere Einzelheiten zu den maßgebenden Fristen und Erfordernissen der ausgewählten Ämter sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

Name und Postanschrift der mit der internationalen Prüfung beauftragten Behörde



Europäisches Patentamt
D-80298 München
Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d
Fax: +49 89 2399 - 4465

Bevollmächtigter Bediensteter

Vullo, C

Tel. +49 89 2399-8061



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)


| | | |
|--|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2607 - hu/km | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/10/1998 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 27/10/1997 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/18 | | |
| Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM ... et al | | |

- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.
 - ☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|---|
| Datum der Einreichung des Antrags 25/05/1999 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.01.00 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter Vollbach, S Tel. Nr. +49 89 2399 8715 |



INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-11 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-7 mit Telefax vom 23/12/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/11-11/11 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 7.

Begründung:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 7 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | |
|--------------------------------|-------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-6 |
| | Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche 1-6 |
| | Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche 1-6 |
| | Nein: Ansprüche |

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

1. Die vorliegende Anmeldung betrifft sechs spezifische Inhibitoren des wnt-Signalweges, die DNA, die diese Inhibitoren kodierende DNA, Antikörper und die Verwendung der Inhibitoren.

Obwohl im Stand der Technik bereits Inhibitoren des wnt Signalweges bereits beschrieben sind (D1: Int. J. Biol., vol. 40:531-535, 1996, D2: Nature, vol. 389, 2.10.1997), sind die beanspruchten Inhibitoren unterschiedlich und nicht in naheliegender Weise herleitbar aus diesem Stand der Technik. Daher entsprechen die Ansprüche 1-6 den Erfordernissen der Artikel 33(2) und 33(3) PCT.

2. Anspruch 7 ist wie folgt zu beanstanden:

In der Anmeldung werden keine experimentellen Daten geliefert, daß die isolierten Klone tatsächlich Verwendung finden in der Diagnostik und Therapie. Tatsächlich ist noch nicht einmal die Expression der Klone (ausgenommen des Klones 2.6 phdk-1) gezeigt worden. Eine potentielle Verwendung selbst der spezifischen Klone ist somit völlig spekulativ. Folglich gibt es auch keine Stützung für die Verwendung der Proteine in der verbreiteten Form d.h. definiert über die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II. . Daher entspricht der Anspruch 7 nicht den Erfordernissen der Artikel 5 und 6 PCT.

PCT/DE98/03155

K 2607 - hu/msl

Patentansprüche

- 5 1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt und durch die DNA von Fig. 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 oder 2.7 bzw. durch eine mit dieser DNA über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA, kodiert wird.
- 10 2. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA jene von Fig. 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 oder 2.7 bzw. eine mit dieser DNA über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA ist.
- 15 3. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2.
4. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 3.
5. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die
20 Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.
6. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 5.
- 25 7. Verwendung eines Proteins, das zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt, bzw. eine für ein solches Protein kodierende DNA zum diagnostischen und/oder therapeutischen Eingreifen in den wnt-Signalweg.

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

Absender: INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

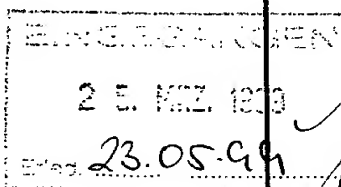
PCT

An

HUBER, Bernard
Huber & Schüssler
Truderinger Strasse 246
D-81825 München
GERMANY

MITTEILUNG ÜBER DIE ÜBERMITTLUNG DES
INTERNATIONALEN RECHERCHENBERICHTS
ODER DER ERKLÄRUNG

(Regel 44.1 PCT)



Absendedatum
(Tag/Monat/Jahr)

23/03/1999

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts

K 2607 - hu/ms1

WEITERES VORGEHEN

siehe Punkte 1 und 4 unten

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03155

Internationales Anmeldedatum

(Tag/Monat/Jahr)

27/10/1998

Anmelder

DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG .et al.

1. ☒ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß der internationale Recherchenbericht erstellt wurde und ihm hiermit übermittelt wird.

Einreichung von Änderungen und einer Erklärung nach Artikel 19:

Der Anmelder kann auf eigenen Wunsch die Ansprüche der internationalen Anmeldung ändern (siehe Regel 46):

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Die Frist zur Einreichung solcher Änderungen beträgt üblicherweise zwei Monate ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts; weitere Einzelheiten sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

Wo sind Änderungen einzureichen?

Unmittelbar beim Internationalen Büro der WIPO, 34, CHEMIN des Colombettes, CH-1211 Genf 20,
Telefaxnr.: (41-22) 740.14.35

Nähere Hinweise sind den Anmerkungen auf dem Beiblatt zu entnehmen.

2. ☐ Dem Anmelder wird mitgeteilt, daß kein internationaler Recherchenbericht erstellt wird und daß ihm hiermit die Erklärung nach Artikel 17(2)a) übermittelt wird.

3. ☐ **Hinsichtlich des Widerspruchs** gegen die Entrichtung einer zusätzlichen Gebühr (zusätzlicher Gebühren) nach Regel 40.2 wird dem Anmelder mitgeteilt, daß

☐ der Widerspruch und die Entscheidung hierüber zusammen mit seinem Antrag auf Übermittlung des Wortlauts sowohl des Widerspruchs als auch der Entscheidung hierüber an die Bestimmungsämter dem Internationalen Büro übermittelt worden sind.

☐ noch keine Entscheidung über den Widerspruch vorliegt; der Anmelder wird benachrichtigt, sobald eine Entscheidung getroffen wurde.

4. **Weiteres Vorgehen:** Der Anmelder wird auf folgendes aufmerksam gemacht:

Kurz nach Ablauf von **18 Monaten** seit dem Prioritätsdatum wird die internationale Anmeldung vom Internationalen Büro veröffentlicht. Will der Anmelder die Veröffentlichung verhindern oder auf einen späteren Zeitpunkt verschieben, so muß gemäß Regel 90 bis bzw. 90bis3 vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung eine Erklärung über die Zurücknahme der internationalen Anmeldung oder des Prioritätsanspruchs beim Internationalen Büro eingehen.

Innerhalb von **19 Monaten** seit dem Prioritätsdatum ist ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung einzureichen, wenn der Anmelder den Eintritt in die nationale Phase bis zu 30 Monaten seit dem Prioritätsdatum (in manchen Ämtern sogar noch länger) verschieben möchte.

Innerhalb von **20 Monaten** seit dem Prioritätsdatum muß der Anmelder die für den Eintritt in die nationale Phase vorgeschriebenen Handlungen vor allen Bestimmungsämtern vornehmen, die nicht innerhalb von 19 Monaten seit dem Prioritätsdatum in der Anmeldung oder einer nachträglichen Auswahlerklärung ausgewählt wurden oder nicht ausgewählt werden konnten, da für sie Kapitel II des Vertrages nicht verbindlich ist.

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde



Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL-2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mireille Claudepierre

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220

Diese Anmerkungen sollen grundlegende Hinweise zur Einreichung von Änderungen gemäß Artikel 19 geben. Diesen Anmerkungen liegen die Erfordernisse des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens (PCT), der Ausführungsordnung und der Verwaltungsrichtlinien zu diesem Vertrag zugrunde. Bei Abweichungen zwischen diesen Anmerkungen und obengenannten Texten sind letztere maßgebend. Nähere Einzelheiten sind dem PCT-Leitfaden für Anmelder, einer Veröffentlichung der WIPO, zu entnehmen.
Die in diesen Anmerkungen verwendeten Begriffe "Artikel", "Regel" und "Abschnitt" beziehen sich jeweils auf die Bestimmungen des PCT-Vertrags, der PCT-Ausführungsordnung bzw. der PCT-Verwaltungsrichtlinien.

HINWEISE ZU ÄNDERUNGEN GEMÄSS ARTIKEL 19

Nach Erhalt des internationalen Recherchenberichts hat der Anmelder die Möglichkeit, einmal die Ansprüche der internationalen Anmeldung zu ändern. Es ist jedoch zu betonen, daß, da alle Teile der internationalen Anmeldung (Ansprüche, Beschreibung und Zeichnungen) während des internationalen vorläufigen Prüfungsverfahrens geändert werden können, normalerweise keine Notwendigkeit besteht, Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 einzureichen, außer wenn der Anmelder z.B. zum Zwecke eines vorläufigen Schutzes die Veröffentlichung dieser Ansprüche wünscht oder ein anderer Grund für eine Änderung der Ansprüche vor ihrer internationalen Veröffentlichung vorliegt. Weiterhin ist zu beachten, daß ein vorläufiger Schutz nur in einigen Staaten erhältlich ist.

Welche Teile der internationalen Anmeldung können geändert werden?

Im Rahmen von Artikel 19 können nur die Ansprüche geändert werden.

In der internationalen Phase können die Ansprüche auch nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert (oder nochmals geändert) werden. Die Beschreibung und die Zeichnungen können nur nach Artikel 34 vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde geändert werden.

Beim Eintritt in die nationale Phase können alle Teile der internationalen Anmeldung nach Artikel 28 oder gegebenenfalls Artikel 41 geändert werden.

Bis wann sind Änderungen einzureichen?

Innerhalb von zwei Monaten ab der Übermittlung des internationalen Recherchenberichts oder innerhalb von sechzehn Monaten ab dem Prioritätsdatum, je nachdem, welche Frist später abläuft. Die Änderungen gelten jedoch als rechtzeitig eingereicht, wenn sie dem Internationalen Büro nach Ablauf der maßgebenden Frist, aber noch vor Abschluß der technischen Vorbereitungen für die internationale Veröffentlichung (Regel 46.1) zugehen.

Wo sind die Änderungen nicht einzureichen?

Die Änderungen können nur beim Internationalen Büro, nicht aber beim Anmeldeamt oder der Internationalen Recherchenbehörde eingereicht werden (Regel 46.2).

Falls ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung eingereicht wurde/wird, siehe unten.

In welcher Form können Änderungen erfolgen?

Eine Änderung kann erfolgen durch Streichung eines oder mehrerer ganzer Ansprüche, durch Hinzufügung eines oder mehrerer neuer Ansprüche oder durch Änderung des Wortlauts eines oder mehrerer Ansprüche in der eingereichten Fassung.

Für jedes Anspruchsblatt, das sich aufgrund einer oder mehrerer Änderungen von dem ursprünglich eingereichten Blatt unterscheidet, ist ein Ersatzblatt einzureichen.

Alle Ansprüche, die auf einem Ersatzblatt erscheinen, sind mit arabischen Ziffern zu nummerieren. Wird ein Anspruch gestrichen, so brauchen, die anderen Ansprüche nicht neu nummeriert zu werden. Im Fall einer Neunummerierung sind die Ansprüche fortlaufend zu nummerieren (Verwaltungsrichtlinien, Abschnitt 205 b)).

Die Änderungen sind in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Welche Unterlagen sind den Änderungen beizufügen?

Begleitschreiben (Abschnitt 205 b)):

Die Änderungen sind mit einem Begleitschreiben einzureichen.

Das Begleitschreiben wird nicht zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht. Es ist nicht zu verwechseln mit der "Erklärung nach Artikel 19(1)" (siehe unten, "Erklärung nach Artikel 19 (1)").

Das Begleitschreiben ist nach Wahl des Anmelders in englischer oder französischer Sprache abzufassen. Bei englischsprachigen internationalen Anmeldungen ist das Begleitschreiben aber ebenfalls in englischer, bei französischsprachigen internationalen Anmeldungen in französischer Sprache abzufassen.

ANMERKUNGEN ZU FORMBLATT PCT/ISA/220 (Fortsetzung)

Im Begleitschreiben sind die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen anzugeben. So ist insbesondere zu jedem Anspruch in der internationalen Anmeldung anzugeben (gleichlautende Angaben zu verschiedenen Ansprüchen können zusammengefaßt werden), ob

- i) der Anspruch unverändert ist;
- ii) der Anspruch gestrichen worden ist;
- iii) der Anspruch neu ist;
- iv) der Anspruch einen oder mehrere Ansprüche in der eingereichten Fassung ersetzt;
- v) der Anspruch auf die Teilung eines Anspruchs in der eingereichten Fassung zurückzuführen ist.

Im folgenden sind Beispiele angegeben, wie Änderungen im Begleitschreiben zu erläutern sind:

1. [Wenn anstelle von ursprünglich 48 Ansprüchen nach der Änderung einiger Ansprüche 51 Ansprüche existieren]:
"Die Ansprüche 1 bis 29, 31, 32, 34, 35, 37 bis 48 werden durch geänderte Ansprüche gleicher Numerierung ersetzt; Ansprüche 30, 33 und 36 unverändert; neue Ansprüche 49 bis 51 hinzugefügt."
2. [Wenn anstelle von ursprünglich 15 Ansprüchen nach der Änderung aller Ansprüche 11 Ansprüche existieren]:
"Geänderte Ansprüche 1 bis 11 treten an die Stelle der Ansprüche 1 bis 15."
3. [Wenn ursprünglich 14 Ansprüche existierten und die Änderungen darin bestehen, daß einige Ansprüche gestrichen werden und neue Ansprüche hinzugefügt werden]:
Ansprüche 1 bis 6 und 14 unverändert; Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt. "Oder" Ansprüche 7 bis 13 gestrichen; neue Ansprüche 15, 16 und 17 hinzugefügt; alle übrigen Ansprüche unverändert."
4. [Wenn verschiedene Arten von Änderungen durchgeführt werden]:
"Ansprüche 1-10 unverändert; Ansprüche 11 bis 13, 18 und 19 gestrichen; Ansprüche 14, 15 und 16 durch geänderten Anspruch 14 ersetzt; Anspruch 17 in geänderte Ansprüche 15, 16 und 17 unterteilt; neue Ansprüche 20 und 21 hinzugefügt."

"Erklärung nach Artikel 19(1)" (Regel 46.4)

Den Änderungen kann eine Erklärung beigelegt werden, mit der die Änderungen erläutert und ihre Auswirkungen auf die Beschreibung und die Zeichnungen dargelegt werden (die nicht nach Artikel 19 (1) geändert werden können).

Die Erklärung wird zusammen mit der internationalen Anmeldung und den geänderten Ansprüchen veröffentlicht.

Sie ist in der Sprache abzufassen, in der die internationale Anmeldung veröffentlicht wird.

Sie muß kurz gehalten sein und darf, wenn in englischer Sprache abgefaßt oder ins Englische übersetzt, nicht mehr als 500 Wörter umfassen.

Die Erklärung ist nicht zu verwechseln mit dem Begleitschreiben, das auf die Unterschiede zwischen den Ansprüchen in der eingereichten Fassung und den geänderten Ansprüchen hinweist, und ersetzt letzteres nicht. Sie ist auf einem gesonderten Blatt einzureichen und in der Überschrift als solche zu kennzeichnen, vorzugsweise mit den Worten "Erklärung nach Artikel 19 (1)".

Die Erklärung darf keine herabsetzenden Äußerungen über den internationalen Recherchenbericht oder die Bedeutung von in dem Bericht angeführten Veröffentlichungen enthalten. Sie darf auf im internationalen Recherchenbericht angeführte Veröffentlichungen, die sich auf einen bestimmten Anspruch beziehen, nur im Zusammenhang mit einer Änderung dieses Anspruchs Bezug nehmen.

Auswirkungen eines bereits gestellten Antrags auf internationale vorläufige Prüfung

Ist zum Zeitpunkt der Einreichung von Änderungen nach Artikel 19 bereits ein Antrag auf internationale vorläufige Prüfung gestellt worden, so sollte der Anmelder in seinem Interesse gleichzeitig mit der Einreichung der Änderungen beim Internationalen Büro auch eine Kopie der Änderungen bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde einreichen (siehe Regel 52.2 a), erster Satz).

Auswirkungen von Änderungen hinsichtlich der Übersetzung der internationalen Anmeldung beim Eintritt in die nationale Phase

Der Anmelder wird darauf hingewiesen, daß bei Eintritt in die nationale Phase möglicherweise anstatt oder zusätzlich zu der Übersetzung der Ansprüche in der eingereichten Fassung eine Übersetzung der nach Artikel 19 geänderten Ansprüche an die bestimmten/ausgewählten Ämter zu übermitteln ist.

Nähere Einzelheiten über die Erfordernisse jedes bestimmten/ausgewählten Amtes sind Band II des PCT-Leitfadens für Anmelder zu entnehmen.

**VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS**

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|---|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2607 - hu/msl | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE 98/ 03155 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/10/1998 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/10/1997 |
| Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG ..et al. | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ **Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen** (siehe Feld I).

3. ☐ **Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung** (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9,10, insoweit bezogen auf ein in Vivo Verfahren sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

Der Antrag ist bei der zuständigen mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde oder, wenn zwei oder mehr Behörden zuständig sind, bei der vom Anmelder gewählten Behörde einzureichen. Der Anmelder kann den Namen oder den Zweibuchstaben-Code der Behörde auf der nachstehenden Zeile angeben.

IPEA/ _____

PCT

KAPITEL II

ANTRAG AUF INTERNATIONALE VORLÄUFIGE PRÜFUNG

nach Artikel 31 des Vertrags über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens:
Der (die) Unterzeichnete(n) beantragt (beantragen), daß für die nachstehend bezeichnete internationale Anmeldung die internationale vorläufige Prüfung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens durchgeführt wird.

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

| | |
|----------------------|---------------------------|
| Bezeichnung der IPEA | Eingangsdatum des ANTRAGS |
|----------------------|---------------------------|

| | | |
|---|---|---|
| Feld Nr. I KENNZEICHNUNG DER INTERNATIONALEN ANMELDUNG | | Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2607 - hu/km |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27.10.1998 | (Frühester) Prioritätstag (Tag/Monat/Jahr) 27.10.1997 |
| Bezeichnung der Erfindung Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs | | |
| Feld Nr. II ANMELDER | | |
| Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) Deutsches Krebsforschungszentrum Stiftung des öffentlichen Rechts Im Neuenheimer Feld 280 D-69120 Heidelberg | | Telefonnr.: Telefaxnr.: Fernschreiber.: |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE | |
| Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) NIEHRS, Christof Klingenteichstr. 6b D-69117 Heidelberg | | |
| Staatsangehörigkeit (Staat): DE | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE | |
| Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.) GLINKA, Andrei Erlenweg 22 D-69126 Heidelberg | | |
| Staatsangehörigkeit (Staat): RU | Sitz oder Wohnsitz (Staat): DE | |
| <input type="checkbox"/> Weitere Anmelder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben. | | |

Feld Nr. III ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person ist ☒ Anwalt ☐ gemeinsamer Vertreter
 und ☒ ist vom (von den) Anmelder(n) bereits früher bestellt worden und vertritt ihn (sie) auch für die internationale vorläufige Prüfung.
☐ wird hiermit bestellt: eine etwaige frühere Bestellung eines Anwalts/gemeinsamen Vertreters wird hiermit widerrufen.
☐ wird hiermit zusätzlich zu dem bereits früher bestellten Anwalt/gemeinsamen Vertreter, nur für das Verfahren vor der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde bestellt.

Name und Anschrift: *(Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)*

SCHÜSSLER, Andrea
 Huber & Schüßler
 Truderinger Str. 246
 81825 München

Telefonnr.:

089/427 247 48

Telefaxnr.:

089/427 247 49

Fernschreibnr.:

☐ Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben wird.

Feld Nr. IV ERKLÄRUNG BETREFFEND ÄNDERUNGEN

Der Anmelder wünscht, daß die mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde*

- i) ☒ die internationale vorläufige Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung aufnimmt.
- ii) ☐ die Änderungen nach Artikel 34
☐ der Beschreibung (Änderungen liegen bei)
☐ der Ansprüche (Änderungen liegen bei)
☐ der Zeichnungen (Änderungen liegen bei)
 berücksichtigt.
- iii) ☐ die beim Internationalen Büro eingereichten Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 berücksichtigt (Kopie liegt bei).
- iv) ☐ die Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 nicht berücksichtigt, sondern als überholt ansieht.
- v) ☐ den Beginn der internationalen vorläufigen Prüfung bis zum Ablauf von 20 Monaten ab dem Prioritätsdatum aufschiebt, sofern die Behörde nicht eine Kopie nach Artikel 19 vorgenommener Änderungen oder eine Erklärung des Anmelders erhält, daß er keine solchen Änderungen vornehmen will (Regel 69.1 d)). *(Dieses Kästchen darf nur angekreuzt werden, wenn die Frist nach Artikel 19 noch nicht abgelaufen ist.)*

* Wenn kein Kästchen angekreuzt wird, wird mit der internationalen vorläufigen Prüfung auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der ursprünglich eingereichten Fassung begonnen; wenn eine Kopie der Änderungen der Ansprüche nach Artikel 19 und/oder Änderungen der internationalen Anmeldung nach Artikel 34 bei der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde eingeht, bevor diese mit der Erstellung eines schriftlichen Bescheids oder des internationalen vorläufigen Prüfungsberichts begonnen hat, wird jedoch die geänderte Fassung verwendet.

Feld Nr. V BENENNUNG VON STAATEN ALS AUSGEWÄHLTE STAATEN

☒ Der Anmelder benennt als ausgewählte Staaten alle auswählbaren Staaten *(das heißt, alle Staaten, die bestimmt wurden und durch Kapitel II des PCT gebunden sind)* ausgenommen

(Möchte der Anmelder bestimmte Staaten nicht auswählen, sind die Namen oder Zweibuchstaben-Codes dieser Staaten auf den obenstehenden Zeilen anzugeben.)



Feld Nr. VI KONTROLLISTE

Dem Antrag liegen folgende Unterlagen für die Zwecke der internationalen vorläufigen Prüfung bei:

- | | | |
|--|---|---------|
| 1. Änderungen nach Artikel 34 | | |
| Beschreibung | : | Blätter |
| Ansprüche | : | Blätter |
| Zeichnungen | : | Blätter |
| 2. Begleitschreiben zu den | | |
| Änderungen nach Artikel 34 | : | Blätter |
| 3. Kopie der Änderungen nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 4. Kopie einer Erklärung nach Artikel 19 | : | Blätter |
| 5. Sonstige (einzeln auführen) : | : | Blätter |

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

erhalten nicht erhalten

| | |
|--------------------------|--------------------------|
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |
| <input type="checkbox"/> | <input type="checkbox"/> |

Dem Antrag liegen außerdem die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei:

- | | |
|--|---|
| 1. <input type="checkbox"/> unterzeichnete gesonderte Vollmacht | 4. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| 2. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht | 5. <input checked="" type="checkbox"/> sonstige (einzeln auführen): |
| 3. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen der Unterschrift | Scheck Nr. 312765089 |

Feld Nr. VII UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS, ANWALTS ODER GEMEINSAMEN VERTRETERS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 25. Mai 1999


Dr. Andrea Schübler
Patentanwältin

Von der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde auszufüllen

- | | |
|--|---|
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs des ANTRAGS: | |
| 2. Geändertes Eingangsdatum des Antrags aufgrund von BERICHTIGUNGEN nach Regel 60.1.b): | |
| 3. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags NACH Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum; Punkt 4 und Punkt 5, unten, finden keine Anwendung. | <input type="checkbox"/> Der Anmelder wurde entsprechend unterrichtet |
| 4. <input type="checkbox"/> Eingangsdatum des Antrags INNERHALB 19 Monate ab Prioritätsdatum wegen Fristverlängerung nach Regel 80.5. | |
| 5. <input type="checkbox"/> Das Eingangsdatum des Antrags liegt nach Ablauf von 19 Monaten ab Prioritätsdatum, der verspätete Eingang ist aber nach Regel 82 ENTSCHULDIGT. | |

Vom Internationalen Büro auszufüllen

Antrag vom IPEA erhalten am:



VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

REC'D 26 JAN 2000

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

| | | |
|--|---|---|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2607 - hu/km | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416) | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/10/1998 | Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 27/10/1997 |
| Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/18 | | |
| Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM ... et al | | |



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 4 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☒ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt 1 Blätter.

3. Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☒ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

| | |
|--|---|
| Datum der Einreichung des Antrags 25/05/1999 | Datum der Fertigstellung dieses Berichts 20.01.00 |
| Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465 | Bevollmächtigter Bediensteter Vollbach, S Tel. Nr. +49 89 2399 8715  |

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-11 ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-7 mit Telefax vom 23/12/1999

Zeichnungen, Blätter:

1/11-11/11 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
- ☐ Ansprüche, Nr.:
- ☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

III. Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit

Folgende Teile der Anmeldung wurden nicht daraufhin geprüft, ob die beanspruchte Erfindung als neu, auf erfinderischer Tätigkeit beruhend (nicht offensichtlich) und gewerblich anwendbar anzusehen ist:

- ☐ die gesamte internationale Anmeldung.
- ☒ Ansprüche Nr. 7.

Begründung:

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03155

- ☐ Die gesamte internationale Anmeldung, bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. beziehen sich auf den nachstehenden Gegenstand, für den keine internationale vorläufige Prüfung durchgeführt werden braucht (*genaue Angaben*):
- ☐ Die Beschreibung, die Ansprüche oder die Zeichnungen (*machen Sie hierzu nachstehend genaue Angaben*) oder die obengenannten Ansprüche Nr. sind so unklar, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte (*genaue Angaben*):
- ☒ Die Ansprüche bzw. die obengenannten Ansprüche Nr. 7 sind so unzureichend durch die Beschreibung gestützt, daß kein sinnvolles Gutachten erstellt werden konnte.
- ☐ Für die obengenannten Ansprüche Nr. wurde kein internationaler Recherchenbericht erstellt.

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

| | |
|--------------------------------|--------------------------------------|
| Neuheit (N) | Ja: Ansprüche 1-6 Nein: Ansprüche |
| Erfinderische Tätigkeit (ET) | Ja: Ansprüche 1-6 Nein: Ansprüche |
| Gewerbliche Anwendbarkeit (GA) | Ja: Ansprüche 1-6 Nein: Ansprüche |

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

1. Die vorliegende Anmeldung betrifft sechs spezifische Inhibitoren des wnt-Signalweges, die DNA, die diese Inhibitoren kodierende DNA, Antikörper und die Verwendung der Inhibitoren.

Obwohl im Stand der Technik bereits Inhibitoren des wnt Signalweges bereits beschrieben sind (D1: Int. J. Biol., vol. 40:531-535, 1996, D2: Nature, vol. 389, 2.10.1997), sind die beanspruchten Inhibitoren unterschiedlich und nicht in naheliegender Weise herleitbar aus diesem Stand der Technik. Daher entsprechen die Ansprüche 1-6 den Erfordernissen der Artikel 33(2) und 33(3) PCT.

2. Anspruch 7 ist wie folgt zu beanstanden:

In der Anmeldung werden keine experimentellen Daten geliefert, daß die isolierten Klone tatsächlich Verwendung finden in der Diagnostik und Therapie. Tatsächlich ist noch nicht einmal die Expression der Klone (ausgenommen des Klones 2.6 phdk-1) gezeigt worden. Eine potentielle Verwendung selbst der spezifischen Klone ist somit völlig spekulativ. Folglich gibt es auch keine Stützung für die Verwendung der Proteine in der verbreiteten Form d.h. definiert über die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II. . Daher entspricht der Anspruch 7 nicht den Erfordernissen der Artikel 5 und 6 PCT.

16. November 1999

10

PCT/DE98/03155

K 2607 - hu/msl

Patentansprüche

- 5 1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt und durch die DNA von Fig. 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 oder 2.7 bzw. durch eine mit dieser DNA über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA kodiert wird.
- 10 2. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1, wobei die DNA jene von Fig. 2.1, 2.3, 2.4, 2.5, 2.6 oder 2.7 bzw. eine mit dieser DNA über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA ist.
- 15 3. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 2.
4. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 3.
- 20 5. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1, umfassend die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 4 unter geeigneten Bedingungen.
6. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 5.
- 25 7. Verwendung eines Proteins, das zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt, bzw. eine für ein solches Protein kodierende DNA zum diagnostischen und/oder therapeutischen Eingreifen in den wnt-Signalweg.

AMENDED SHEET

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

| | | |
|--|---|--|
| Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts K 2607 - hu/msl | WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5 | |
| Internationales Aktenzeichen PCT/DE 98/03155 | Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/10/1998 | (Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 27/10/1997 |
| Anmelder DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG ..et al. | | |

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in Schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☐ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der **Bezeichnung der Erfindung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der **Zusammenfassung**

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

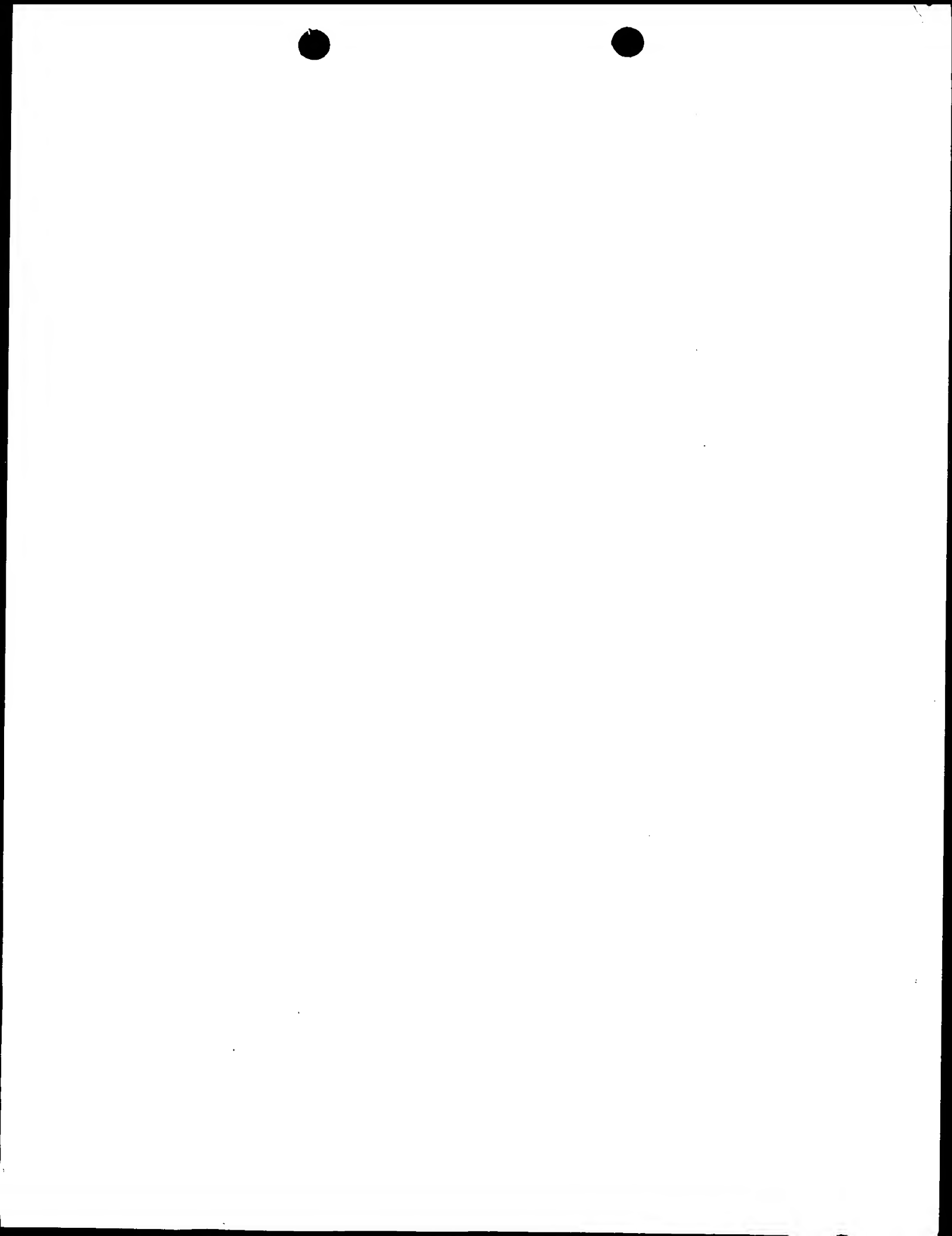
6. Folgende Abbildung der **Zeichnungen** ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. _____

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

☒ keine der Abb.



Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9,10, insoweit bezogen auf ein in Vivo Verfahren sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/DE 98/03155

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Remark: Although claims 9, 10 relate to a method for treating the human/animal body insofar as they relate to an in vivo method, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.



INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03155

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/18 C07K14/475 C07K16/22 C12N5/10 A61K38/22
A61K48/00 G01N33/53 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C07K C12N

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| X | SAWADA K ET AL: "Characterization of terminally differentiated cell state by categorizing cDNA clones derived from chicken lens fibers." INT J DEV BIOL, JUN 1996, 40 (3) P531-5, XP002096086 SPAIN siehe das ganze Dokument | 3,4 |
| X | -& EMVRT DATABASE Accession number D26311 29-JUL-1994 (Rel. 40, Created) Sawada K XP002096089 siehe das ganze Dokument --- -/- | 3,4 |



Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen



Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" Älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

10. März 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

23/03/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Gurdjian, D

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

| Kategorie* | Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile | Betr. Anspruch Nr. |
|------------|--|--------------------|
| A | GLINKA A ET AL: "Head induction by simultaneous repression of Bmp and Wnt signalling in Xenopus." NATURE, OCT 2 1997, 389 (6650) P517-9, XP002096087 ENGLAND siehe das ganze Dokument ----- | 1-10 |
| P,X | GLINKA, ANDREI ET AL: "Dickkopf-1 is a member of a new family of secreted proteins and functions in head induction" NATURE (LONDON) (1998), 391(6665), 357-362 CODEN: NATUAS;ISSN: 0028-0836, XP002096088 siehe das ganze Dokument ----- | 1-10 |

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03155

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl die Ansprüche 9,10, insoweit bezogen auf ein in Vivo Verfahren sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen Körpers beziehen, wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen, daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.



1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65
66
67
68
69
70
71
72
73
74
75
76
77
78
79
80
81
82
83
84
85
86
87
88
89
90
91
92
93
94
95
96
97
98
99
100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200
201
202
203
204
205
206
207
208
209
210
211
212
213
214
215
216
217
218
219
220
221
222
223
224
225
226
227
228
229
230
231
232
233
234
235
236
237
238
239
240
241
242
243
244
245
246
247
248
249
250
251
252
253
254
255
256
257
258
259
260
261
262
263
264
265
266
267
268
269
270
271
272
273
274
275
276
277
278
279
280
281
282
283
284
285
286
287
288
289
290
291
292
293
294
295
296
297
298
299
300
301
302
303
304
305
306
307
308
309
310
311
312
313
314
315
316
317
318
319
320
321
322
323
324
325
326
327
328
329
330
331
332
333
334
335
336
337
338
339
340
341
342
343
344
345
346
347
348
349
350
351
352
353
354
355
356
357
358
359
360
361
362
363
364
365
366
367
368
369
370
371
372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386
387
388
389
390
391
392
393
394
395
396
397
398
399
400
401
402
403
404
405
406
407
408
409
410
411
412
413
414
415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429
430
431
432
433
434
435
436
437
438
439
440
441
442
443
444
445
446
447
448
449
450
451
452
453
454
455
456
457
458
459
460
461
462
463
464
465
466
467
468
469
470
471
472
473
474
475
476
477
478
479
480
481
482
483
484
485
486
487
488
489
490
491
492
493
494
495
496
497
498
499
500
501
502
503
504
505
506
507
508
509
510
511
512
513
514
515
516
517
518
519
520
521
522
523
524
525
526
527
528
529
530
531
532
533
534
535
536
537
538
539
540
541
542
543
544
545
546
547
548
549
550
551
552
553
554
555
556
557
558
559
560
561
562
563
564
565
566
567
568
569
570
571
572
573
574
575
576
577
578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597
598
599
600
601
602
603
604
605
606
607
608
609
610
611
612
613
614
615
616
617
618
619
620
621
622
623
624
625
626
627
628
629
630
631
632
633
634
635
636
637
638
639
640
641
642
643
644
645
646
647
648
649
650
651
652
653
654
655
656
657
658
659
660
661
662
663
664
665
666
667
668
669
670
671
672
673
674
675
676
677
678
679
680
681
682
683
684
685
686
687
688
689
690
691
692
693
694
695
696
697
698
699
700
701
702
703
704
705
706
707
708
709
710
711
712
713
714
715
716
717
718
719
720
721
722
723
724
725
726
727
728
729
730
731
732
733
734
735
736
737
738
739
740
741
742
743
744
745
746
747
748
749
750
751
752
753
754
755
756
757
758
759
760
761
762
763
764
765
766
767
768
769
770
771
772
773
774
775
776
777
778
779
780
781
782
783
784
785
786
787
788
789
790
791
792
793
794
795
796
797
798
799
800
801
802
803
804
805
806
807
808
809
810
811
812
813
814
815
816
817
818
819
820
821
822
823
824
825
826
827
828
829
830
831
832
833
834
835
836
837
838
839
840
841
842
843
844
845
846
847
848
849
850
851
852
853
854
855
856
857
858
859
860
861
862
863
864
865
866
867
868
869
870
871
872
873
874
875
876
877
878
879
880
881
882
883
884
885
886
887
888
889
890
891
892
893
894
895
896
897
898
899
900
901
902
903
904
905
906
907
908
909
910
911
912
913
914
915
916
917
918
919
920
921
922
923
924
925
926
927
928
929
930
931
932
933
934
935
936
937
938
939
940
941
942
943
944
945
946
947
948
949
950
951
952
953
954
955
956
957
958
959
960
961
962
963
964
965
966
967
968
969
970
971
972
973
974
975
976
977
978
979
980
981
982
983
984
985
986
987
988
989
990
991
992
993
994
995
996
997
998
999
1000

Claims

1. An inhibitor protein of the wnt signal path, wherein the protein comprises at least one of the amino acid consensus sequences I and II indicated in fig. 1.
2. The protein according to claim 1, wherein the protein comprises the amino acid consensus sequences I and II.
3. A DNA coding for the protein according to claim 1 or 2.
4. The DNA according to claim 3, wherein the DNA comprises:

the DNA of fig. 2 or a DNA differing therefrom by one or several base pairs,
a DNA hybridizing with the DNA of (a) or
a DNA related to the DNA of (a) or (b) via the degenerated genetic code.
5. An expression plasmid, comprising the DNA according to claim 3 or 4.
6. A transformant, containing the expression plasmid according to claim 5.
7. A process for the preparation of the protein according to claim 1 or 2, comprising the culturing of the transformant according to claim 6 under suitable conditions.
8. Antibodies directed against the protein according to claim 1 or 2.

9. Use of the protein according to claim 1 or 2 as a reagent for diagnosis and/or treatment.
10. Use of the DNA according to claim 3 or 4 as a reagent for diagnosis and/or treatment.

PCT

ANTRAG

Der Unterzeichnete beantragt, daß die vorliegende internationale Anmeldung nach dem Vertrag über die internationale Zusammenarbeit auf dem Gebiet des Patentwesens behandelt wird.

Vom Anmeldeamt auszufüllen

Internationales Aktenzeichen

Internationales Anmeldedatum

Name des Anmeldeamts und "PCT International Application"

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts (falls gewünscht)
(max. 12 Zeichen) K 2607 - hu/ms1

Feld Nr. I BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG

Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

Feld Nr. II ANMELDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

Deutsches Krebsforschungszentrum
Stiftung des öffentlichen Rechts
Im Neuenheimer Feld 280
D-69120 Heidelberg

☐ Diese Person ist gleichzeitig Erfinder

Telefonnr.:

Telefaxnr.:

Fernschreibnr.:

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☒ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☐ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)

NIEHRS, Christof
Klingenteichstr. 6b
D-69117 Heidelberg

Diese Person ist:

☐ nur Anmelder

☒ Anmelder und Erfinder

☐ nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)

Staatsangehörigkeit (Staat):

DE

Sitz oder Wohnsitz (Staat):

DE

Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten:

☐ alle Bestimmungsstaaten

☐ alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika

☒ nur die Vereinigten Staaten von Amerika

☐ die im Zusatzfeld angegebenen Staaten

☒ Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem Fortsetzungsblatt angegeben.

Feld Nr. IV ANWALT ODER GEMEINSAMER VERTRETER; ODER ZUSTELLANSCHRIFT

Die folgende Person wird hiermit bestellt/ist bestellt worden, um für den (die) Anmelder vor den zuständigen internationalen Behörden in folgender Eigenschaft zu handeln als:

☒ Anwalt

☐ gemeinsamer Vertreter

Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben.)

Dr. Bernard Huber
Truderinger Str. 246
81825 München

Telefonnr.:

089/42724748

Telefaxnr.:

089/42724749

Fernschreibnr.:

☐ Zustellanschrift: Dieses Kästchen ist anzukreuzen, wenn kein Anwalt oder gemeinsamer Vertreter bestellt ist und statt dessen im obigen Feld eine spezielle Zustellanschrift angegeben ist.



| | |
|--|---|
| Fortsetzung von Feld Nr. III WEITERE ANMELDER UND/ODER (WEITERE) ERFINDER | |
| <i>Wird keines der folgenden Felder benutzt, so sollte dieses Blatt dem Antrag nicht beigelegt werden.</i> | |
| <p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> <p>GLINKA, Andrei Erlenweg 22 D-69126 Heidelberg</p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): <div style="text-align: center;">RU</div> | Sitz oder Wohnsitz (Staat): <div style="text-align: center;">DE</div> |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input checked="" type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): | Sitz oder Wohnsitz (Staat): |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): | Sitz oder Wohnsitz (Staat): |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p><small>Name und Anschrift: (Familienname, Vorname; bei juristischen Personen vollständige amtliche Bezeichnung. Bei der Anschrift sind die Postleitzahl und der Name des Staats anzugeben. Der in diesem Feld in der Anschrift angegebene Staat ist der Staat des Sitzes oder Wohnsitzes des Anmelders, sofern nachstehend kein Staat des Sitzes oder Wohnsitzes angegeben ist.)</small></p> | <p>Diese Person ist:</p> <p><input type="checkbox"/> nur Anmelder</p> <p><input type="checkbox"/> Anmelder und Erfinder</p> <p><input type="checkbox"/> nur Erfinder (Wird dieses Kästchen angekreuzt, so sind die nachstehenden Angaben nicht nötig.)</p> |
| Staatsangehörigkeit (Staat): | Sitz oder Wohnsitz (Staat): |
| <p>Diese Person ist Anmelder für folgende Staaten: <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten <input type="checkbox"/> alle Bestimmungsstaaten mit Ausnahme der Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> nur die Vereinigten Staaten von Amerika <input type="checkbox"/> die im Zusatzfeld angegebenen Staaten</p> | |
| <p><input type="checkbox"/> Weitere Anmelder und/oder (weitere) Erfinder sind auf einem zusätzlichen Fortsetzungsblatt angegeben.</p> | |



2 3
1 1

Feld Nr. V BESTIMMUNG VON STAATEN

Die folgenden Bestimmungen nach Regel 4.9 Absatz a werden hiermit vorgenommen (bitte die entsprechenden Kästchen ankreuzen; wenigstens ein Kästchen muß angekreuzt werden):

Regionales Patent

- ☐ AP **ARIPO-Patent:** GH Ghana, GM Gambia, KE Kenia, LS Lesotho, MW Malawi, SD Sudan, SZ Swasiland, UG Uganda, ZW Simbabwe und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Harare-Protokolls und des PCT ist
- ☐ EA **Eurasisches Patent:** AM Armenien, AZ Aserbaidshan, BY Belarus, KG Kirgisistan, KZ Kasachstan, MD Republik Moldau, RU Russische Föderation, TJ Tadschikistan, TM Turkmenistan und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Eurasischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☒ EP **Europäisches Patent:** AT Österreich, BE Belgien, CH und LI Schweiz und Liechtenstein, CY Zypern, DE Deutschland, DK Dänemark, ES Spanien, FI Finnland, FR Frankreich, GB Vereinigtes Königreich, GR Griechenland, IE Irland, IT Italien, LU Luxemburg, MC Monaco, NL Niederlande, PT Portugal, SE Schweden und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat des Europäischen Patentübereinkommens und des PCT ist
- ☐ OA **OAPI-Patent:** BF Burkina Faso, BJ Benin, CF Zentralafrikanische Republik, CG Kongo, CI Côte d'Ivoire, CM Kamerun, GA Gabun, GN Guinea, ML Mali, MR Mauretanien, NE Niger, SN Senegal, TD Tschad, TG Togo und jeder weitere Staat, der Vertragsstaat der OAPI und des PCT ist (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben)

Nationales Patent (falls eine andere Schutzrechtsart oder ein sonstiges Verfahren gewünscht wird, bitte auf der gepunkteten Linie angeben):

- | | |
|---|---|
| <input type="checkbox"/> AL Albanien | <input type="checkbox"/> LS Lesotho |
| <input type="checkbox"/> AM Armenien | <input type="checkbox"/> LT Litauen |
| <input type="checkbox"/> AT Österreich | <input type="checkbox"/> LU Luxemburg |
| <input type="checkbox"/> AU Australien | <input type="checkbox"/> LV Lettland |
| <input type="checkbox"/> AZ Aserbaidshan | <input type="checkbox"/> MD Republik Moldau |
| <input type="checkbox"/> BA Bosnien-Herzegowina | <input type="checkbox"/> MG Madagaskar |
| <input type="checkbox"/> BB Barbados | <input type="checkbox"/> MK Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien |
| <input type="checkbox"/> BG Bulgarien | <input type="checkbox"/> MN Mongolei |
| <input type="checkbox"/> BR Brasilien | <input type="checkbox"/> MW Malawi |
| <input type="checkbox"/> BY Belarus | <input type="checkbox"/> MX Mexiko |
| <input type="checkbox"/> CA Kanada | <input type="checkbox"/> NO Norwegen |
| <input type="checkbox"/> CH und LI Schweiz und Liechtenstein | <input type="checkbox"/> NZ Neuseeland |
| <input type="checkbox"/> CN China | <input type="checkbox"/> PL Polen |
| <input type="checkbox"/> CU Kuba | <input type="checkbox"/> PT Portugal |
| <input type="checkbox"/> CZ Tschechische Republik | <input type="checkbox"/> RO Rumänien |
| <input type="checkbox"/> DE Deutschland | <input type="checkbox"/> RU Russische Föderation |
| <input type="checkbox"/> DK Dänemark | <input type="checkbox"/> SD Sudan |
| <input type="checkbox"/> EE Estland | <input type="checkbox"/> SE Schweden |
| <input type="checkbox"/> ES Spanien | <input type="checkbox"/> SG Singapur |
| <input type="checkbox"/> FI Finnland | <input type="checkbox"/> SI Slowenien |
| <input type="checkbox"/> GB Vereinigtes Königreich | <input type="checkbox"/> SK Slowakei |
| <input type="checkbox"/> GE Georgien | <input type="checkbox"/> SL Sierra Leone |
| <input type="checkbox"/> GH Ghana | <input type="checkbox"/> TJ Tadschikistan |
| <input type="checkbox"/> GM Gambia | <input type="checkbox"/> TM Turkmenistan |
| <input type="checkbox"/> GW Guinea-Bissau | <input type="checkbox"/> TR Türkei |
| <input type="checkbox"/> HR Kroatien | <input type="checkbox"/> TT Trinidad und Tobago |
| <input type="checkbox"/> HU Ungarn | <input type="checkbox"/> UA Ukraine |
| <input type="checkbox"/> ID Indonesien | <input type="checkbox"/> UG Uganda |
| <input type="checkbox"/> IL Israel | <input checked="" type="checkbox"/> US Vereinigte Staaten von Amerika |
| <input checked="" type="checkbox"/> JP Japan | <input type="checkbox"/> UZ Usbekistan |
| <input type="checkbox"/> KE Kenia | <input type="checkbox"/> VN Vietnam |
| <input type="checkbox"/> KG Kirgisistan | <input type="checkbox"/> YU Jugoslawien |
| <input type="checkbox"/> KP Demokratische Volksrepublik Korea | <input type="checkbox"/> ZW Simbabwe |
| <input type="checkbox"/> KR Republik Korea | |
| <input type="checkbox"/> KZ Kasachstan | |
| <input type="checkbox"/> LC Saint Lucia | |
| <input type="checkbox"/> LK Sri Lanka | |
| <input type="checkbox"/> LR Liberia | |

Kästchen für die Bestimmung von Staaten (für die Zwecke eines nationalen Patents), die dem PCT nach der Veröffentlichung dieses Formblatts beigetreten sind:

Erklärung bzgl. vorsorglicher Bestimmungen: Zusätzlich zu den oben genannten Bestimmungen nimmt der Anmelder nach Regel 4.9 Absatz b auch alle anderen nach dem PCT zulässigen Bestimmungen vor mit Ausnahme der im Zusatzfeld genannten Bestimmungen, die von dieser Erklärung ausgenommen sind. Der Anmelder erklärt, daß diese zusätzlichen Bestimmungen unter dem Vorbehalt einer Bestätigung stehen und jede zusätzliche Bestimmung, die vor Ablauf von 15 Monaten ab dem Prioritätsdatum nicht bestätigt wurde, nach Ablauf dieser Frist als vom Anmelder zurückgenommen gilt. (Die Bestätigung einer Bestimmung erfolgt durch die Einreichung einer Mitteilung, in der diese Bestimmung angegeben wird, und die Zahlung der Bestimmungs- und der Bestätigungsgebühr. Die Bestätigung muß beim Anmeldeamt innerhalb der Frist von 15 Monaten eingehen.)



2 2
1 1

| Feld Nr. VI PRIORITÄTSANSPRUCH | | <input type="checkbox"/> Weitere Prioritätsansprüche sind im Zusatzfeld angegeben. | | |
|--|-------------------------------------|--|-------------------------------------|--------------------------------------|
| Anmeldedatum der früheren Anmeldung (Tag/Monat/Jahr) | Aktenzeichen der früheren Anmeldung | Ist die frühere Anmeldung eine: | | |
| | | ationale Anmeldung: Staat | regionale Anmeldung: regionales Amt | internationale Anmeldung: Anmeldeamt |
| Zeile (1) Deutschland | 27. Oktober 1997 (27.10.97) | 197 47 418:7 | | |
| Zeile (2) | | | | |
| Zeile (3) | | | | |

☒ Das Anmeldeamt wird ersucht, eine beglaubigte Abschrift der oben in der (den) Zeile(n) 1 bezeichneten früheren Anmeldung(en) zu erstellen und dem internationalen Büro zu übermitteln (nur falls die frühere Anmeldung(en) bei dem Amt eingereicht worden ist(sind), das für die Zwecke dieser internationalen Anmeldung Anmeldeamt ist)

* Falls es sich bei der früheren Anmeldung um eine ARIPO-Anmeldung handelt, so muß in dem Zusatzfeld mindestens ein Staat angegeben werden, der Mitgliedstaat der Pariser Verbandsübereinkunft zum Schutz des gewerblichen Eigentums ist und für den die frühere Anmeldung eingereicht wurde.

Feld Nr. VII INTERNATIONALE RECHERCHENBEHÖRDE

| | |
|--|---|
| Wahl der internationalen Recherchenbehörde (ISA) (falls zwei oder mehr als zwei internationale Recherchenbehörden für die Ausführung der internationalen Recherche zuständig sind, geben Sie die von Ihnen gewählte Behörde an; der Zweibuchstaben-Code kann benutzt werden) | Antrag auf Nutzung der Ergebnisse einer früheren Recherche: Bezugnahme auf diese frühere Recherche (falls eine frühere Recherche bei der internationalen Recherchenbehörde beantragt oder von ihr durchgeführt worden ist): |
| ISA / EPA | Datum (Tag/Monat/Jahr) Aktenzeichen Staat (oder regionales Amt) |

Feld Nr. VIII KONTROLLISTE; EINREICHUNGSSPRACHE

| | |
|--|---|
| Diese internationale Anmeldung enthält die folgende Anzahl von Blättern: | Dieser internationalen Anmeldung liegen die nachstehend angekreuzten Unterlagen bei: |
| Antrag : 4 | 1. <input checked="" type="checkbox"/> Blatt für die Gebührenberechnung |
| Beschreibung (ohne Sequenzprotokollteil) : 14 | 2. <input type="checkbox"/> Gesonderte unterzeichnete Vollmacht |
| Ansprüche : 2 | 3. <input type="checkbox"/> Kopie der allgemeinen Vollmacht; Aktenzeichen (falls vorhanden): |
| Zusammenfassung : 1 | 4. <input type="checkbox"/> Begründung für das Fehlen einer Unterschrift |
| Zeichnungen : 11 | 5. <input type="checkbox"/> Prioritätsbeleg(e), in Feld Nr. VI durch folgende Zeilennummer gekennzeichnet: |
| Sequenzprotokollteil der Beschreibung : 7 | 6. <input type="checkbox"/> Übersetzung der internationalen Anmeldung in die folgende Sprache: |
| Blattzahl insgesamt : 39 | 7. <input type="checkbox"/> Gesonderte Angaben zu hinterlegten Mikroorganismen oder anderem biologischen Material |
| Abbildung der Zeichnungen, die mit der Zusammenfassung veröffentlicht werden soll (Nr.): | 8. <input checked="" type="checkbox"/> Protokoll der Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenzen in computerlesbarer Form |
| | 9. <input checked="" type="checkbox"/> Sonstige (einzeln auflisten): Scheck, Kopie f. Priobeleg |
| | Sprache, in der die internationale Anmeldung eingereicht wird: |

Feld Nr. IX. UNTERSCHRIFT DES ANMELDERS ODER DES ANWALTS

Der Name jeder unterzeichnenden Person ist neben der Unterschrift zu wiederholen, und es ist anzugeben, sofern sich dies nicht eindeutig aus dem Antrag ergibt, in welcher Eigenschaft die Person unterzeichnet.

München, 27. Oktober 1998

Dr. Bernard Huber

| | | | |
|--|-------|---|--|
| Vom Anmeldeamt auszufüllen | | 2. Zeichnungen | |
| 1. Datum des tatsächlichen Eingangs dieser internationalen Anmeldung: | | <input type="checkbox"/> eingegangen: | |
| 3. Geändertes Eingangsdatum aufgrund nachträglich, jedoch fristgerecht eingegangener Unterlagen oder Zeichnungen zur Vervollständigung dieser internationalen Anmeldung: | | <input type="checkbox"/> nicht eingegangen: | |
| 4. Datum des fristgerechten Eingangs der angeforderten Richtigstellungen nach Artikel 11(2) PCT: | | 6. <input type="checkbox"/> Übermittlung des Recherchenexemplars bis zur Zahlung der Recherchegebühr aufgeschoben | |
| 5. Internationale Recherchenbehörde (falls zwei oder mehr zuständig sind): | ISA / | | |

| |
|--|
| Vom Internationalen Büro auszufüllen |
| Datum des Eingangs des Aktenexemplars beim Internationalen Büro: |

Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

5

Der wnt-Signalweg spielt eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellproliferation und -Differenzierung während der Embryonal-Entwicklung von Drosophila, Xenopus laevis und der Maus. Der wnt-Signalweg umfaßt die Kombination von sekretorischen Glykoproteinen, die durch wnt-Gene, z.B. Xwnt-8, kodiert sind, und wnt-Rezeptoren, an die die Glykoproteine binden. Ferner ist der wnt-Signalweg beim Menschen kausal im Colon- und Mammakarzinom sowie dem Melanom impliziert (vgl. Peifer, M., Science 275, (1997), 1752-1753). Inhibitoren des wnt-Signalwegs könnten daher eine Möglichkeit darstellen, therapeutisch bei Tumorerkrankungen eingreifen zu können.

15

Der vorliegenden Erfindung liegt somit die Aufgabe zugrunde, ein Mittel bereitzustellen, mit dem der wnt-Signalweg inhibiert werden kann.

20

Erfindungsgemäß wird dies durch die Gegenstände in den Patentansprüchen erreicht.

25

Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist somit ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II umfaßt.

Die vorliegende Erfindung beruht auf der Erkenntnis des Anmelders, daß in Tieren, besonders Säugetieren, ganz besonders dem Menschen, ein Protein existiert, das den wnt-Signalweg inhibiert. Der Anmelder hat gefunden, daß die

Expression des wnt-Gens, Xwnt-8, in *Xenopus laevis* zur Ausbildung von Siamesischen Zwillingen führt. Diese Mißbildung wird verhindert, wenn gleichzeitig das vorstehende Protein exprimiert wird. Dieses Protein ist ein sekretorisches Protein von etwa 40 kD. Es weist zumindest eine der in Fig. 1 angegebenen Cystein-
5 reichen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf. Varianten des Proteins sind in Form ihrer DNAs in Fig. 2 angegeben. Desweiteren hat der Anmelder erkannt, daß Varianten des Proteins in unterschiedlichen Geweben exprimiert werden (vgl. Tabelle 1 und Fig. 3).

10 In der vorliegenden Erfindung wird vorstehendes Protein mit "wnt-Inhibitor" (wnt-I) bezeichnet.

In bevorzugter Ausführungsform weist (wnt-I) die in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II auf.

15 Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist eine für (wnt-I) kodierende Nukleinsäure. Diese kann eine RNA oder eine DNA sein. Letztere kann z.B. eine genomische DNA oder eine cDNA sein. Bevorzugt ist eine DNA, die folgendes umfaßt:

20 (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Basenpaare unterschiedliche DNA,

(b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA, oder

25 (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten genetischen Code verwandte DNA.

30 Der Ausdruck "hybridisierende DNA" weist auf eine DNA hin, die unter üblichen Bedingungen, insbesondere bei 20°C unter dem Schmelzpunkt der DNA, mit einer DNA von (a) hybridisiert.

Die DNA von Fig. 2 umfaßt sieben DNAs, die aus *Xenopus laevis*, Maus, Mensch oder Huhn stammen und für (wnt-I) kodieren. Sechs dieser DNAs wurden bei der DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen) am 19. Sept. 1997 wie folgt hinterlegt:

5

- Fig. 2.1 (DNA aus Mensch) als phdkk-3 unter DSM 11762
- Fig. 2.2 (DNA aus Huhn) trägt die Bezeichnung pcdkk-3
- Fig. 2.3 (DNA aus Maus) als pmdkk-2 unter DSM 11759
- Fig. 2.4 (DNA aus Mensch) als phdkk-2 unter DSM 11761
- 10 Fig. 2.5 (DNA aus Maus) als pmdkk-1 unter DMS 11758
- Fig. 2.6 (DNA aus Mensch) als phdkk-1 unter DSM 11760
- Fig. 2.7 (DNA aus *Xenopus laevis*) als pRNdkk-1 unter DSM 11757

15

Nachstehend wird eine erfindungsgemäße DNA in Form einer cDNA beschrieben. Diese steht beispielhaft für jede unter die vorliegende Erfindung fallende DNA.

20

25

Zur Herstellung einer erfindungsgemäßen cDNA ist es günstig, von einer *Xenopus laevis*-cDNA-Bibliothek auszugehen (vgl. Glinka, A. et al., *Mechanisms Develop* 60, (1996), 221-231). Von den einzelnen cDNA-Klonen werden mittels RNA-Polymerase entsprechende mRNAs synthetisiert. Diese werden zusammen mit mRNA von wnt-Genen, z.B. Xwnt-8, in *Xenopus laevis* mikroinjiziert. Es wird auf die Ausbildung von Siamesischen Zwillingen bei *Xenopus laevis* gescreent. Diese werden erhalten, wenn die mRNA des wnt-Gens alleine oder zusammen mit solcher *Xenopus laevis* mRNA mikroinjiziert wird, die nicht für (wnt-I) kodiert. Das Nicht-Auftreten von Siamesischen Zwillingen wird somit als Nachweis für das Vorliegen einer mRNA gewertet, die für (wnt-I) kodiert. Solch eine mRNA läßt unmittelbar die entsprechende cDNA erkennen.

30

Eine erfindungsgemäße cDNA kann in einem Vektor bzw. Expressionsvektor vorliegen. Beispiele solcher sind dem Fachmann bekannt. Im Falle eines Expressionsvektors für *E. coli* sind dies z.B. pGEMEX, pUC-Derivate, pGEX-2T, pET3b und pQE-8. Für die Expression in Hefe sind z.B. pY100 und Ycpad1 zu



11

nennen, während für die Expression in tierischen Zellen z.B. pKCR, pEFBOS, cDM8 und pCEV4, anzugeben sind. Für die Expression in Insektenzellen eignet sich besonders der Baculovirus-Expressionsvektor pAcSGHisNT-A.

5 Der Fachmann kennt geeignete Zellen, um eine, erfindungsgemäße, in einem Expressionsvektor vorliegende cDNA zu exprimieren. Beispiele solcher Zellen umfassen die E.coli-Stämme HB101, DH1, x1776, JM101, JM 109, BL21 und SG 13009, den Hefe-Stamm *Saccharomyces cerevisiae* und die tierischen Zellen L, 3T3, FM3A, CHO, COS, Vero und HeLa sowie die Insektenzellen sf9.

10 Der Fachmann weiß, in welcher Weise eine erfindungsgemäße cDNA in einen Expressionsvektor inseriert werden muß. Ihm ist auch bekannt, daß diese cDNA in Verbindung mit einer für ein anderes Protein bzw. Peptid kodierenden DNA inseriert werden kann, so daß die erfindungsgemäße cDNA in Form eines Fusionsproteins exprimiert werden kann.

15

Des weiteren kennt der Fachmann Bedingungen, transformierte bzw. trans-fizierte Zellen zu kultivieren. Auch sind ihm Verfahren bekannt, das durch die erfindungsgemäße cDNA exprimierte Protein zu isolieren und zu reinigen. Ein solches Protein, das auch ein Fusionsprotein sein kann, ist somit ebenfalls Gegenstand der vorliegenden Erfindung.

20

Ein weiterer Gegenstand der vorliegenden Erfindung ist ein gegen ein vorstehen-des Protein bzw. Fusionsprotein gerichteter Antikörper. Ein solcher Antikörper kann durch übliche Verfahren hergestellt werden. Er kann polyklonal bzw. monoklonal sein. Zu seiner Herstellung ist es günstig, Tiere, insbesondere Kaninchen oder Hühner für einen polyklonalen und Mäuse für einen monoklonalen Antikörper, mit einem vorstehenden (Fusions)protein oder Fragmenten davon zu immunisieren. Weitere "Booster" der Tiere können mit dem gleichen (Fu-sions)protein oder Fragmenten davon erfolgen. Der polyklonale Antikörper kann dann aus dem Serum bzw. Eigelb der Tiere erhalten werden. Für den monoklo-nalen Antikörper werden Milzzellen der Tiere mit Myelomzellen fusioniert.

25

30



11

Die vorliegende Erfindung ermöglicht es, den wnt-Signalweg besser zu untersuchen und zu verstehen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-I) in Organismen nachgewiesen werden. Ferner kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-I) ein gegen dieses Protein gerichteter Autoantikörper nachgewiesen werden. Beide Nachweise können durch übliche Verfahren, insbesondere einen Western Blot, einen ELISA, eine Immunpräzipitation oder durch Immunfluoreszenz, erfolgen. Desweiteren kann mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA und hiervon abgeleiteten Primern, die Expression des für (wnt-I) kodierenden Gens nachgewiesen werden. Dieser Nachweis kann in üblicher Weise, insbesondere in einem Southern Blot, erfolgen.

Somit können mit der vorliegenden Erfindung auch Prozesse besser untersucht, d.h. diagnostiziert, und verstanden werden, die mit dem wnt-Signalweg zusammenhängen. Dies sind z.B. Zellproliferation und -Differenzierung sowie Erkrankungen verschiedener Art. Beispiele von letzteren sind Erkrankungen des Auges und der Knochen sowie Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinom sowie Melanom.

Desweiteren eignet sich die vorliegende Erfindung, Maßnahmen für und gegen das Vorliegen von (wnt-I) in Organismen zu ergreifen. Mit einem erfindungsgemäßen Antikörper kann (wnt-I) in Organismen inhibiert werden. Andererseits kann mit einem erfindungsgemäßen (wnt-I), insbesondere nach Kopplung an ein vom Körper nicht als fremd angesehenes Protein, z.B. Transferrin oder BSA, die Menge von (wnt-I) in Organismen erhöht werden. Entsprechendes kann auch mit einer erfindungsgemäßen Nukleinsäure, insbesondere einer DNA, erreicht werden, die unter die Kontrolle eines in bestimmten Geweben induzierbaren Promotors gestellt wird und nach ihrer Expression zur Bereitstellung von (wnt-I) in diesen Geweben führt. Darüberhinaus kann eine erfindungsgemäße Nukleinsäure, insbesondere eine DNA, auch zur Inhibierung von (wnt-I) genutzt werden. Hierzu wird die Nukleinsäure, z.B. als Basis für die Erstellung von Anti-Sinn-Oligonukleotiden zur Expressions-Inhibierung des für (wnt-I) kodierenden Gens verwendet.

Somit stellt die vorliegende Erfindung auch die Möglichkeit bereit, in den wnt-Signalweg aktivierend bzw. inhibierend einzugreifen. Erstes könnte z.B durch Verabreichung eines erfindungsgemäßen Antikörpers gegen (wnt-I) erfolgen. Für letzteres bietet sich an, erfindungsgemäßes (wnt-I) zu verabreichen. Die Aktivierung des wnt-Signalwegs könnte sinnvoll sein, wenn daran gedacht wird, Organismen für Organspende zu züchten. Die Inhibierung des wnt-Signalwegs bietet sich allerdings an, um therapeutisch bei Erkrankungen von Knochen und des Auges sowie bei Tumorerkrankungen, insbesondere Colon- und Mammakarzinomen sowie Melanom, eingreifen zu können.

Insbesondere zeichnet sich die vorliegende Erfindung dadurch aus, daß sie gewebespezifisch eingesetzt werden kann. Dies gilt sowohl für Diagnose als auch für Therapie. Beispielsweise eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-1, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Bindegewebe und Auge. Ferner eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-2, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Bindegewebe, Nieren, Hoden, Milz, Ovarien, Muskel, Uterus, Knorpel, Auge und Brustdrüse. Desweiteren eignet sich eine erfindungsgemäße DNA, DKK-3, ein entsprechendes Protein bzw. ein Antikörper davon, besonders für Gewebe, wie Gehirn, Herz, Gefäße, Knochen, Knorpel, Auge, Bindegewebe, Lunge, Ovarien, Muskel und Brustdrüse.

Kurze Beschreibung der Zeichnungen:

Fig. 1 zeigt die Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II eines erfindungsgemäßen (wnt-I). Die Angabe "-" bedeutet eine Aminosäure, wobei die Zahl der Aminosäuren variabel ist, wenn sie einen Stern aufweisen,

Fig. 2 zeigt die Basensequenz von sieben (wnt-I) kodierenden DNAs mit Angabe der Basen, die zu den Aminosäure-Konsensus-Sequenzen



11

von (wnt-I) beitragen.

Fig. 3 zeigt die Expression von drei (wnt-I) kodierenden DNAs, DKK-1, DKK-2 und DKK-3, in Geweben.

5

Die vorliegende Erfindung wird durch die nachstehenden Beispiele erläutert.

Beispiel 1: Herstellung und Reinigung eines erfindungsgemäßen (wnt-I)

Zur Herstellung eines erfindungsgemäßen (wnt-I) wurde die DNA von Fig. 2.6, phdkk-1 mit Bam HI-Linkern versehen, anschließend mit Bam HI gespalten und
10 in den mit Bam HI gespaltenen Expressionsvektors pQE-8 (Qiagen) inseriert. Es wurde das Expressionsplasmid pQ/wnt-I erhalten. Ein solches kodiert für ein Fusionsprotein aus 6 Histidin-Resten (N-Terminuspartner) und einem erfindungsgemäßen (wnt-I) (C-Terminuspartner). pQ/wnt-I wurde zur Transformation von
15 E.coli SG 13009(vgl. Gottesman, S. et al., J. Bacteriol. 148, (1981), 265-273) verwendet. Die Bakterien wurden in einem LB-Medium mit 100µg/ml Ampicillin und 25µg/ml Kanamycin kultiviert und 4 h mit 60µM Isopropyl-β-D-Thiogalactopyranosid (IPTG) induziert. Durch Zugabe von 6 M Guanidinhydrochlorid wurde eine Lyse der Bakterien erreicht, anschließend wurde mit dem Lysat eine Chromatographie (Ni-NTA-Resin) in Gegenwart von 8 M Harnstoff entsprechend der
20 Angaben des Herstellers (Diagen) des Chromatographie-Materials durchgeführt. Das gebundene Fusionsprotein wurde in einem Puffer mit pH 3,5 eluiert. Nach seiner Neutralisierung wurde das Fusionsprotein einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterworfen und mit Coomassie-Blau angefärbt (vgl. Thomas, J.O. und Kornberg, R.D., J.Mol.Biol. 149 (1975), 709-733).
25

Es zeigte sich, daß ein erfindungsgemäßes (Fusions)protein in hochreiner Form hergestellt werden kann.

30

Beispiel 2: Herstellung und Nachweis eines erfindungsgemäßen Antikörpers

Ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 wurde einer 18 % SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen. Nach Anfärbung des Gels mit 4 M



Natriumacetat wurde eine ca. 40 kD Bande aus dem Gel herausgeschnitten und in Phosphat gepufferter Kochsalzlösung inkubiert. Gel-Stücke wurden sedimentiert, bevor die Proteinkonzentration des Überstandes durch eine SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, der eine Coomassie-Blau-Färbung folgte, bestimmt wurde. Mit dem Gel-gereinigten Fusionsprotein wurden Tiere wie folgt immunisiert:

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Kaninchen

Pro Immunisierung wurden 35 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,7 ml PBS und 0,7 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

- Tag 0: 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 14: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 28: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 56: 4. Immunisierung (icFA)
Tag 80: Ausbluten

Das Serum des Kaninchens wurde im Immunoblot getestet. Hierzu wurde ein erfindungsgemäßes Fusionsprotein von Beispiel 1 einer SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese unterzogen und auf ein Nitrocellulosefilter übertragen (vgl. Khyse-Andersen, J., J. Biochem. Biophys. Meth. 10, (1984), 203-209). Die Western Blot-Analyse wurde wie in Bock, C.-T. et al., Virus Genes 8, (1994), 215-229, beschrieben, durchgeführt. Hierzu wurde das Nitrocellulosefilter eine Stunde bei 37°C mit einem ersten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war das Serum des Kaninchens (1:10000 in PBS). Nach mehreren Waschschritten mit PBS wurde das Nitrocellulosefilter mit einem zweiten Antikörper inkubiert. Dieser Antikörper war ein mit alkalischer Phosphatase gekoppelter monoklonaler Ziege Anti-Kaninchen-IgG-Antikörper (Dianova) (1:5000) in PBS. Nach 30-minütiger Inkubation bei 37°C folgten mehrere Waschschriffe mit PBS und anschließend die alkalische Phosphatase-Nachweisreaktion mit Entwicklerlösung (36 µM 5' Bromo-4-chloro-3-indolylphosphat, 400 µM Nitroblau-tetrazolium, 100 mM Tris-HCl, pH 9.5, 100 mM NaCl, 5 mM MgCl₂) bei Raumtemperatur, bis Banden sichtbar waren.



11

Es zeigte sich, daß erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper hergestellt werden können.

Immunisierungsprotokoll für polyklonale Antikörper im Huhn

- 5 Pro Immunisierung wurden 40 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,8 ml PBS und 0,8 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt.

Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
10 Tag 50: 3. Immunisierung (icFA)

Aus Eigelb wurden Antikörper extrahiert und im Western Blot getestet. Es wurden erfindungsgemäße, polyklonale Antikörper nachgewiesen.

15 Immunisierungsprotokoll für monoklonale Antikörper der Maus

Pro Immunisierung wurden 12 µg Gel-gereinigtes Fusionsprotein in 0,25 ml PBS und 0,25 ml komplettem bzw. inkomplettem Freund's Adjuvans eingesetzt; bei der 4. Immunisierung war das Fusionsprotein in 0,5 ml (ohne Adjuvans) gelöst.

20 Tag 0. 1. Immunisierung (komplettes Freund's Adjuvans)
Tag 28: 2. Immunisierung (inkomplettes Freund's Adjuvans; icFA)
Tag 56: 3. Immunisierung (icFA)
Tag 84: 4. Immunisierung (PBS)
Tag 87: Fusion

25 Überstände von Hybridomen wurden im Western Blot getestet. Erfindungsgemäße, monoklonale Antikörper wurden nachgewiesen.

30



11

Tabelle 1: Expression von erfindungsgemäßen DNAs in Mausembryonen

| | Dkk-1 | Dkk-2 | Dkk-3 |
|------------------------|--|----------------------|--------------------------------------|
| Neuroepithelium | | | |
| E9.5 diencephalon | +++ ventral | +++ medial | + medial |
| E12.5 | telencephalon M/mantle | hypothalamus | telencephalon M/ ventricular zone |
| Eye | pigmented epithelium | choroid | retina |
| Spinal cord | -/+ | | ventricular zone Roof plate |
| Mesoderm: | | | |
| Heart E10 | bulbis cordis Endocardium septum transversum | endothelium | myocardium |
| Heart E12 | endocardial cushion | endothelium | endocardial cushion |
| Blood vessels | +++ aorta | +++ pulmonary artery | +++ aorta + pulmonary artery |
| Limbud mesenchyme | E9 S | I | D |
| Bone E12 | perichondrium | S /mesenchyme | perichondrium I/mesenchyme |



11

| | | | |
|------------------|--------------------------------|-------------|-----|
| Bone E15 | Ossification centers | | |
| Urogenital | nephric duct | | |
| | S-shaped body | metanephric | |
| | Comma shaped body | mesenchyme | |
| Palate | +++ | ++ | + |
| Hair follicle | +++ mesenchyme + epithelium | + | + |
| Tooth mesenchyme | - | - | +++ |
| Trunk mesoderm | +/- | +++ | ++ |

Legende: Mesoderm: (D) deep, (I) intermediate (L) lateral, (M) medial, (S), superficial.
 Expressionsstärke: (-) absence, (+/-) very weak expression, (+) medium, (++) strong, (+++) very strong.



2 1

Patentansprüche

- 5 1. Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, wobei das Protein zumindest eine
 der in Fig. 1 angegebenen Aminosäure-Konsensus-Sequenzen I und II
 umfaßt.
2. Protein nach Anspruch 1, wobei das Protein die Aminosäure-Konsensus-
10 Sequenzen I und II umfaßt.
3. DNA, kodierend für das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
4. DNA nach Anspruch 3, wobei die DNA umfaßt:
- 15 (a) die DNA von Fig. 2 oder eine hiervon durch ein oder mehrere Ba-
 senpaare unterschiedliche DNA,
- (b) eine mit der DNA von (a) hybridisierende DNA oder
- (c) eine mit der DNA von (a) oder (b) über den degenerierten geneti-
 schen Code verwandte DNA.
- 20 5. Expressionsplasmid, umfassend die DNA nach Anspruch 3 oder 4.
6. Transformante, enthaltend das Expressionsplasmid nach Anspruch 5.
- 25 7. Verfahren zur Herstellung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2, umfas-
 send die Kultivierung der Transformante nach Anspruch 6 unter geeigne-
 ten Bedingungen.
8. Antikörper, gerichtet gegen das Protein nach Anspruch 1 oder 2.
- 30 9. Verwendung des Proteins nach Anspruch 1 oder 2 als Reagens zur Dia-
 gnose und/oder Therapie.



10. Verwendung der DNA nach Anspruch 3 oder 4 als Reagens zur Diagnose und/oder Therapie.



1 1

Zusammenfassung

5

Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs

10

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Inhibitor-Protein des wnt-Signalwegs, eine ein solches Protein kodierende DNA und ein Verfahren zur Herstellung eines solchen Proteins. Ferner betrifft die Erfindung die Verwendung der DNA und des Proteins sowie gegen das Protein gerichtete Antikörper.

